

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS APARECIDA DULZ

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE  
ANOSTOMIDAE (TELEOSTEI: CHARACIFORMES): ÊNFASE NA FRAÇÃO  
REPETITIVA DO DNA

CURITIBA

2019

THAIS APARECIDA DULZ

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE  
ANOSTOMIDAE (TELEOSTEI: CHARACIFORMES): ÊNFASE NA FRAÇÃO  
REPETITIVA DO DNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutora em  
Ciências Biológicas, área de concentração  
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari  
Coorientadora: Dra. Carla Andreia Lorscheider

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Dulz, Thais Aparecida

Estudo da diferenciação cromossômica em espécies de Anostomidae  
(Teleostei: Characiformes): ênfase na fração repetitiva do DNA. / Thais  
Aparecida Dulz. – Curitiba, 2019.  
129 p. : il.

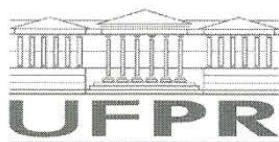
Orientador: Marcelo Ricardo Vicari

Coorientadora: Carla Andreia Lorscheider

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Cromossomos sexuais 2. Citogenética 3. Evolução (Biologia) I.  
Título II. Vicari, Marcelo Ricardo III. Lorscheider, Carla Andreia IV.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 572.87



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -  
40001016006P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THAIS APARECIDA DULZ** intitulada: **Estudo da diferenciação cromossômica em espécies de *Anostomidae* (Teleostei: Characiformes): ênfase na fração repetitiva do DNA.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2019.

MARCELO RICARDO VICARI  
Presidente da Banca Examinadora

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER  
Avaliador Externo (UEPG)

KALINE ZIEMNICZAK  
Avaliador Externo (UNESPAR)

PATRICIA BARBOSA  
Avaliador Externo (UNESPAR)

ORLANDO MOREIRA-FILHO  
Avaliador Externo (UFSCAR)

*Dedico este trabalho as pessoas mais  
importantes da minha vida, minha mãe  
Rosangela e ao meu pai Luis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e coragem para que eu pudesse concluir mais esta etapa de minha carreira acadêmica.

O meu agradecimento especial aos meus pais, Rosangela e Luis, por todas as orações, aconselhamentos, preocupações, apoio e incentivo, e acima de tudo, pelo seu amor incondicional. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Amo vocês!

À minha irmã Thatielle, pelo seu carinho, seu amor e pelas palavras de força.

Ao meu esposo Vinícius, pela paciência ao longo destes anos; por compreender as minhas ausências, e por sempre estar ao meu lado. Te Amo!

A todos os meus familiares que me apoiaram. De maneira especial a minha tia Rosemari, as minhas primas Manu e Thainara, por fazer meus dias mais felizes. Aos meus avós (Rosa e José) *in memoriam*, por torcerem pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, um professor e pesquisador extremamente competente. Agradeço pela oportunidade de ser sua orientada, por todos os ensinamentos, pela paciência e por sua amizade. Muito Obrigada!

À Profa. Dra. Carla Andreia Lorscheider, minha coorientadora, por ter me inserido no “mundo da citogenética”. Agradeço pelo incentivo e pela ajuda durante a minha caminhada acadêmica e profissional. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto, pelo seu apoio e suas contribuições com a minha pesquisa, principalmente por disponibilizar o seu laboratório para que eu realizasse a parte experimental do meu doutorado.

À Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari pelo auxílio, pela compreensão e pela amizade.

Agradeça à minha banca de acompanhamento Dra. Michele Orane Schemberger e Dra. Marta Margarete Cestari, pelas contribuições durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora da tese Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, à Dra. Michele Orane Schemberger, à Profa. Dra. Kaline e à Profa. Dra. Patrícia Barbosa por terem aceitado o convite e pelas correções e contribuições com o meu trabalho.

À minha querida amiga e “irmã” Ieda, por sempre estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei e com sua calma me ajudou a resolver os meus problemas. Obrigada “Miga”!

À Viviane, uma grande amiga. Agradeço pela sua pronta disponibilidade para ajudar, pela sua amizade sincera e pelo seu apoio. E aos demais amigos do laboratório CBSF, Lucas,

Geize, Larissa, Carol, Matheus e Sebastião, pelo companheirismo, amizade, ajuda nos meus experimentos, e pelas boas risadas. Muito Obrigada!

Ao meu aluno Diego, por ter contribuído com a realização deste trabalho.

Ao seu Tico, pela sua disponibilidade nas inúmeras coletas de peixes.

A todos os professores que passaram pela minha vida e contribuíram com a minha formação acadêmica. Muito Obrigada!

A todos os membros da Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura e Função, pela infraestrutura.

À Universidade Estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória e ao Laboratório de Pesquisa.

Às agências de fomento do CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

Agradeço a todas as pessoas, colegas e amigos, que direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o  
melhor, mas lutei para que o melhor fosse  
feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a  
Deus, não sou o que era antes”.*  
*(Marthin Luther King)*

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira  
de pensar, não seremos capazes de resolver os  
problemas causados pela forma como nos  
acostumamos a ver o mundo”.*  
*(Albert Einstein)*



## RESUMO

Anostomidae é uma família de peixes neotropicais rica em número de espécies e presente na grande maioria das bacias hidrográficas sul-americanas. Citogeneticamente é proposto que seus representantes têm  $2n$  conservado de 54 cromossomos meta e submetacêntricos. Apesar da sua estabilidade cariotípica, os anostomídeos possuem diferentes padrões quanto à distribuição de heterocromatina e de sequências repetitivas de DNA. Além disso, nas espécies do gênero *Megaleporinus*, são encontrados cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW. Estudos realizados com enfoque nos DNAs repetitivos são restritos a algumas espécies desta família; e também são relacionados com o processo de evolução dos cromossomos sexuais em diversos grupos de peixes. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi analisar o papel dos DNAs repetitivos no processo de diversificação cariotípica dos anostomídeos, além de avaliar a participação destes DNAs na origem e diferenciação dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus*. Neste estudo foram analisadas populações/espécies de *Leporellus vittatus*, *Leporinus friderici*, *Megaleporinus obtusidens* e *Megaleporinus reinhardti* por meio de citogenética clássica (coloração convencional com Giemsa e Bandamento C), e aplicação de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), para mapear cromossomicamente as famílias multigênicas dos DNA ribossômico (rDNA) 18S e 5S e pequenos RNAs nucleares (snRNA) U1 e U2, expansões de repetições *in tandem* ((TTAGGG) $n$ , (GATA) $n$ , (GA) $_{15}$ , (CA) $_{15}$ , (A) $_{30}$ ) e os elementos transponíveis (*Rex1*, *Rex3* e *Gypsy*). Todas as populações e espécies avaliadas demonstraram o conservadorismo do  $2n$ , com fórmula cariotípica de  $(32m + 22sm)$  para *L. friderici*,  $(28m + 26sm)$  em *L. vittatus* e  $(\sigma 28m + 26sm)$   $(\varphi 28m+25+1st)$  para *Megaleporinus obtusidens* e *M. reinhardti*, nestas duas últimas espécies foi verificada a presença de sistema ZW, onde o W é subtelocêntrico destacadamente maior que o Z e quase totalmente heterocromático, e o Z um submetacêntrico de tamanho médio. Foram observadas variações no número e na localização dos sítios de rDNA e acúmulos diferenciais do retrotransposon *Rex1* nas regiões terminais dos cromossomos das quatro espécies estudadas. Sequências teloméricas intersticiais (ITS) não foram evidenciadas nos cromossomos autossomos, somente no cromossomo W de *Megaleporinus*. Diferenças intra e interespecíficas com relação a localização cromossômica e a acumulação de snRNAs U1 e U2, TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* e as expansões *in tandem* foram evidenciados para os cromossomos autossomos e sexuais Z e W de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. O conjunto de dados obtidos neste estudo confirma a conservação da macroestrutura cariotípica e indicam uma divergência cromossômica a nível intra/interespecíficos dentre os anostomídeos estudados, principalmente quanto as diferenças cariotípicas microestruturais proporcionadas pelo reposicionamento dos rDNAs e pelos acúmulos diferenciais dos demais elementos repetitivos analisados. Os resultados mostraram que diferentes classes de DNAs repetitivos (repetições *in tandem* e TEs) participaram da origem e diferenciação dos cromossomos W em *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. No entanto, o acúmulo diferencial destes DNAs nas regiões heterocromáticas do cromossomo W sugerem que embora os cromossomos sexuais Z e W de *Megaleporinus* compartilhem uma origem comum, as etapas posteriores de diferenciação dos cromossomos sexuais seguiram caminhos evolutivos distintos em cada linhagem.

Palavras-chave: Cromossomos sexuais. Elementos transponíveis. Evolução cariotípica. Repetições *in tandem*. Citogenética.

## ABSTRACT

Anostomidae is a family of Neotropical fishes rich in species numbers and occurs in most of the South American watersheds. Cytogenetically it is proposed that its representatives have preserved 2n of 54 meta and submetacentric chromosomes. Despite their karyotypic stability, anostomids have different levels of relationship between heterochromatin and repetitive DNA sequences. In addition, in species of the genus *Megaleporinus*, differentiated sex chromosomes of the type ZZ / ZW are found. Studies conducted with a focus on repetitive DNAs are restricted to some species of this family; and are also related to the process of evolution of sex chromosomes in various groups of fish. Thus, the objective of the present study was to analyze the role of repetitive DNAs in the process of karyotypic diversification of the anostomids, besides evaluating the participation of these DNAs in the origin and differentiation of the sex chromosomes of *Megaleporinus*. In this study populations/species of *Leporellus vittatus*, *Leporinus friderici*, *Megaleporinus obtusidens* and *Megaleporinus reinhardti* were analyzed by means of classical cytogenetics (conventional staining with Giemsa and C Banding) and application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to map chromosomally the multigenic families of ribosomal DNA (rDNA) 18S e 5S and small nuclear RNAs (snRNA) U1 e U2, repetition expansions *in tandem* ((TTAGGG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (A)<sub>30</sub>) and the transposable elements (*Rex1*, *Rex3* e *Gypsy*). All populations and species evaluated showed 2n conservatism, with a karyotype of (32m + 22sm) for *L. friderici*, (28m + 26sm), in *L. vittatus* and (♂ 28m + 26sm) (♀ 28m+25+1st) for *Megaleporinus obtusidens* and *M. reinhardti*, in these last two species has been verified the presence of ZW system, where W is subtelocentric that is markedly greater than Z and almost completely heterochromatic, and Z a medium-sized submetacentric. Variations were observed in the number and location of rDNA sites and differential accumulations of the retrotransposon *Rex1* in the terminal regions of the chromosomes of the four species studied. Interstitial telomeric sequences (ITS) were not detected in the autosomal chromosomes, only on the W chromosome of *Megaleporinus*. Intra and interspecific differences with respect to chromosome location and the accumulation of snRNAs U1 e U2, TEs *Rex1*, *Rex3* and *Gypsy* and in tandem expansions were evidenced for the autosomal and sexual chromosomes Z and W of *M. obtusidens* and *M. reinhardti*. The data obtained in this study confirm the conservation of the karyotype macrostructure and indicate an intra / interspecific chromosome divergence among the studied anostomids, mainly due to the karyotypic microstructural differences provided by the repositioning of rDNAs and by the accumulation of differences in the other repetitive elements analyzed. The results showed that different classes of repetitive DNAs (*in tandem* and TEs) participated in the origin and differentiation of W chromosomes in *M. obtusidens* and *M. reinhardti*. However, the differential accumulation of these DNAs in the heterochromatic regions of the W chromosome suggests that although the sex chromosomes Z and W of *Megaleporinus* share a common origin, the later stages of differentiation of the sex chromosomes followed different evolutionary paths in each lineage.

**Keywords:** Sex chromosomes. Transposable elements. Karyotype evolution. Repetitions in tandem. Cytogenetics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MATERIAL E MÉTODOS

- FIGURA 1 - Mapa do Brasil com destaque para as bacias hidrográficas, Amazônica, do Paraná, São Francisco a Atlântico Leste, evidenciando os rios e os pontos de coletas. À direita as espécies estudadas denominadas (a, b, c, d) de acordo com seus respectivos locais de coleta.....38

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1 - Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) after conventional Giemsa staining. Scale bar: 10  $\mu$ m.....52
- FIGURA 2 - Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) after C-banding. Scale bar: 10  $\mu$ m.....53
- FIGURA 3- Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA and 5S rDNA probes. Scale bar: 10  $\mu$ m.....54
- FIGURA 4 - Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with *RexI* probe. Scale bar: 10  $\mu$ m.....55
- FIGURA 5 - Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGGG)<sub>n</sub> probe. Scale bar: 10  $\mu$ m.....56

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1 - Sequência do rDNA 5S de *Megaleporinus obtusidens* evidenciando os sítios gênicos conservados.....72
- FIGURA 2 - Cariótipos de *Megaleporinus* após coloração convencional com Giemsa (a, c, e) e Banda C (b, d, e). Barra de escala: 10  $\mu$ m.....73
- FIGURA 3 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S (verde) e rDNA 18S (vermelho). Escala da barra=10  $\mu$ m.....74
- FIGURA 4 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de snDNA U1 e U2. Escala da barra=10  $\mu$ m.....75

FIGURA 5 -	Comparação dos cromossomos Z e W de <i>Megaleporinus</i> após a aplicação de técnicas citogenéticas convencionais (Giemsa e banda C) e de citogenética molecular (FISH) com sondas dos pequenos RNAs nucleares (snRNA U1 e U2). Escala da barra=10 µm.....	76
------------	--	----

### CAPÍTULO III

FIGURA 1 -	Cariótipos de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sondas de RTE <i>Rex1</i> e <i>Rex3</i> . Escala da barra=10 µm.....	91
FIGURA 2 -	Cariótipos de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sonda do RTE <i>Gypsy</i> . Escala da barra=10 µm.....	92
FIGURA 3 -	Cariótipos de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sonda de (TTAGGG) <sub>n</sub> . Escala da barra=10 µm.....	92
FIGURA 4 -	Cariótipos de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sondas de microssatélites (GATA) <sub>n</sub> e (GA) <sub>15</sub> . Escala da barra=10 µm.....	93
FIGURA 5 -	Cariótipos de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sondas de microssatélites (CA) <sub>15</sub> e (A) <sub>30</sub> . Escala da barra=10 µm.....	94
FIGURA 6 -	Comparação dos cromossomos Z e W de <i>Megaleporinus</i> após hibridização <i>in situ</i> fluorescente com diferentes sondas de DNAs repetitivos. Escala da barra=10 µm.....	94

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1 -	Cytogenetic data of <i>Leporinus friderici</i> and <i>Leporellus vittatus</i> analyzed in the present study. SP = São Paulo State, PR = Paraná State, MG = Minas Gerais State, MT = Mato Grosso State, 2n = diploid number, FN = fundamental number, KF = karyotype formula, term = terminal sites.....	51
------------	---	----

### CAPÍTULO II

TABELA 1 -	Conjunto de primers utilizadas para obtenção das sequências repetitivas rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1, snRNA U2.....	71
------------	--	----

### CAPÍTULO III

TABELA 1 -	Conjunto de primers utilizadas para obtenção das sequências repetitivas <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> , Gypsy, (GATA) <i>n</i> e (TTAGGG) <i>n</i> .....	90
------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Ag** - Prata

**CTAB** - Brometo de cetiltrimetilamônio

**DAPI** - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

**DSB**: Quebra de dupla fita

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**dUTP** - Desoxiuridina trifosfato

**DIRS** - Sequência de repetição intermediária de Dictyostelium

**ETS** - Espaçador externo transcrito

**FC** - Fórmula cariotípica

**FISH** - Hibridização *in situ* fluorescente

**Gb** - Gigabase

**ITS** - Espaçador interno transcrito

**ITS** - Sequência telomérica intersticial

**Kb** - Kilobase

**KCl** - Cloreto de potássio

**LDS** - Locus de determinação do sexo

**LINE** - Elementos nucleares intercalados longos

**LTR** – Repetições terminais longas

**m** - Metacêntricos

**µg** - Micrograma

**ml** - Mililitro

**µl** - Microlitro

**µm** - Micrômetro

**mM** - Milimolar

**mRNA** - RNA mensageiro

**MOTUs** - Unidades Taxoconômicas operacionais moleculares

**ng** - Nanograma

**NF** - Número fundamental

**NHEJ** – Junção de extremidade não homólogas

**NTS** - Espaçadores não transcritos

**p** - Braço cromossômico curto

**pb** - Pares de bases

**PBS** - Solução tampão de fosfato de sódio

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PLE** - Retrotransposons tipo Penélope

**q** - Braço cromossômico longo

**rDNA** - DNA ribossômico

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RON** - Região Organizadora de Nucléolo

**rRNA** - RNA ribossômico

**RTE** - Elemento retrotransposon

**SINE** - Elementos nucleares intercalados curtos

**sm** - Submetacêntrico

**snRNA** - Pequenos RNAs Nucleares

**SSR** - Repetição de sequências simples

**st** - Subtelocêntricos

**SSC** - Solução tampão de citrato de sódio

**SSRs** - Repetição de sequências simples

**TEs** - Elementos transponíveis

**TIRs** - Regiões invertidas terminais

**TRIS** - Hidroximetil-aminometano

**U** - Unidade

**VNTR** - Número variável de Repetição *in tandem*

**v** - Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANOSTOMIDAE.....	19
2.1.1	Gênero <i>Megaleporinus</i> .....	20
2.1.2	Gênero <i>Leporinus</i> .....	20
2.1.3	Gênero <i>Leporellus</i> .....	21
2.2	DNA REPETITIVO.....	22
2.2.1	Elementos repetidos <i>in tandem</i> .....	22
2.2.1.1	Famílias multigênicas.....	22
2.2.1.2	DNAs satélites, minissatélites e microsatélites.....	24
2.2.2	Elementos repetitivos dispersos.....	25
2.3	ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA ANOSTOMIDAE: ÊNFASE NOS DNAs REPETITIVOS.....	27
2.3.1	Estudos sobre DNAs repetitivos e cromossomos sexuais do gênero <i>Megaleporinus</i> .....	29
2.4	CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS.....	33
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO E PONTOS DE COLETA.....	38
4.2	MÉTODOS.....	39
4.2.1	Análise cromossômica convencional.....	39
4.2.2	Extração de DNA e amplificação das sequências.....	39
4.2.3	Purificação, sequenciamento e análise das sequências.....	39
4.2.4	Marcação de sondas.....	40
4.2.5	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente.....	40
4.2.6	Análises cariotípicas.....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1	CAPÍTULO I: Comparative cytogenetics among <i>Leporinus friderici</i> and <i>Leporellus vittatus</i> populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements.....	43
5.2	CAPÍTULO II: INFERÊNCIAS SOBRE DIVERSIFICAÇÃO CARIOTÍPICA DE <i>Megaleporinus</i> (CHARACIFORMES:	



	ANOSTOMIDAE) COM BASE NA DISTRIBUIÇÃO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS.....	57
5.3	CAPÍTULO III: EVIDÊNCIAS DA ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DE <i>Megaleporinus obtusidens</i> E <i>Megaleporinus reinhardti</i> (CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE).....	77
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE 1.....	116
	APÊNDICE 2.....	117
	ANEXO 1.....	118
	ANEXO 2.....	119
	ANEXO 3.....	120
	ANEXO 4.....	121
	ANEXO 5.....	123
	ANEXO 6.....	124
	ANEXO 7.....	125
	ANEXO 8.....	126
	ANEXO 9.....	127
	ANEXO 10.....	128

## 1 INTRODUÇÃO

A família Anostomidae é uma das mais especiosas entre os Characiformes, compreendendo 158 espécies válidas, distribuídas em 15 gêneros (BAUMGARTNER et al., 2012; FROESE; PAULY, 2019). Ocorrem na América Central e na América do Sul; são conhecidos popularmente como piaus, piavas e piaparas (GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

O gênero *Megaleporinus* foi descrito recentemente e inclui 10 espécies, é o único grupo desta família a apresentar sistema de cromossomos sexuais diferenciados (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). O gênero *Leporinus* destaca-se pelo seu elevado número de espécies (GARAVELLO; BRITSKI, 2003), e *Leporellus* é considerado o gênero basal na família Anostomidae. Estudos moleculares e citogenéticos envolvendo espécies destes três gêneros sugerem a existência de uma biodiversidade críptica em Anostomidae (AGUILAR; GALLETTI JR, 2008; RAMIREZ et al., 2017; SILVA-SANTOS et al., 2018).

Os cromossomos dos anostomídeos, assim como os demais organismos eucarióticos são compostos principalmente por sequências de DNA repetitivos, as quais estão organizadas em dois grupos: as repetições *in tandem*, que incluem as famílias multigênicas, os DNAs satélites, microssatélites, minissatélites e as repetições dispersas, compreendendo os elementos transponíveis (TEs), que agrupam os transposons de DNA e retrotransposons (SUMNER, 2003; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

A maioria dos estudos envolvendo DNAs repetitivos em anostomídeos está relacionada ao mapeamento cromossômico por hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Os genes ribossomais (rDNA) apresentam o maior número de estudos disponíveis (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000, 2001b, BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019). Em contra partida, análises envolvendo os pequenos RNAs nucleares (snRNA), expansões microssatélites e DNAs satélites são restritas a poucas espécies. Além disso, o único elemento transponível estudado até o momento foi o retrotransposon (RTE) *Rex* (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; SPLENDORE DE BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013; PONZIO; PISCOR; PARISE-MALTEMPI, 2018).

Análises citogenéticas realizadas com representantes da família Anostomidae mostram o conservadorismo quanto ao número diploide de 54 cromossomos, do tipo metacêntricos e submetacêntricos (GALETTI JR, FELDBERG, 2017). No entanto, apesar da sua aparente estabilidade, os anostomídeos possuem diferentes padrões quanto à distribuição e localização de heterocromatina e das sequências repetitivas de DNA (MOLINA; SHIBATTA; GALETTI

JR, 2008; SPLENDORE DE BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013; POLTRONIERI et al., 2014).

O gênero *Megaleporinus* apresentar sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, o cromossomo W é um subtelocêntrico, destacadamente o maior do complemento cromossômico e, possui o braço longo inteiramente heterocromático (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). A composição heterocromática deste cromossomo está relacionada com o acúmulo de sequências repetitivas de DNA, no entanto, muitas delas ainda permanecem desconhecidas, ou restritas a poucas espécies (PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; POLTRONIERI et al., 2014).

Desta forma, realizar a identificação, caracterização e mapeamento de elementos repetitivos são indispensáveis para uma melhor compreensão das diferenças cariotípicas encontradas na família Anostomidae, inclusive dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus*. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo analisar o papel dos DNAs repetitivos no processo de diversificação cariotípica dos anostomídeos, além de avaliar a participação destes DNAs na origem e diferenciação dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANOSTOMIDAE

Anostomidae é uma das famílias mais especiosas entre os Characiformes, representando um dos grupos mais importantes da ictiofauna de água doce. Ocorrem na América Central e na América do Sul e; no Brasil, podem ser encontrados em quase todas as bacias hidrográficas (BAUMGARTNER et al., 2012). Popularmente são conhecidos como piaus, piavas e piaparas (GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

Esta família abrange 158 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2019) distribuídas em 15 gêneros: *Abramites*, *Anostomoides*, *Anostomus*, *Gnathodolus*, *Laemolyta*, *Leporellus*, *Leporinus*, *Pseudanos*, *Rhytiodus*, *Sartor*, *Schizodon* e *Synaptolaemus*, *Petulanos*, *Hypomasticus* e *Megaleporinus* (GARAVELLO; BRITSKI, 2003; SIDLAUSKAS; VARI, 2008; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). Quase todos os gêneros de anostomídeos compreendem duas ou mais espécies, exceto *Gnathodolus* e *Sinaptolaemus* (monotípicos) (GARAVELLO; BRITSKI, 2003).

Anostomidae é considerada um grupo monofilético, seus representantes são caracterizados pelo corpo alongado e fusiforme, variando de pequeno a grande porte (até 80 cm de comprimento padrão) (SIDLAUSKAS; VARI, 2008; NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Apresentam dentes incisiformes, em pequeno número (geralmente de três a quatro), dispostos em uma única série na pré-maxilar e no dentário, o maxilar é reduzido e sem dentes e a boca é relativamente pequena. O grupo também apresenta dentes faríngeos cuspidados, distribuídos em duas placas superiores e duas inferiores (GÉRY, 1977; GARAVELLO; BRITSKI, 2003; GRAÇA; PAVANELLI, 2007; BRITSKI; BIRINDELLI, 2008).

Outras características morfológicas dos anostomídeos compreendem a nadadeira anal curta e a dorsal implantada ao nível médio do corpo com oito a dez raios ramificados, nadadeira dorsal com nove a dez raios e a ventral com sete a nove raios ramificados. Além disso, os anostomídeos apresentam a boca em posição terminal ou subterminal, ligeiramente voltada para cima ou ainda superior (GÉRY, 1977; GARAVELLO; BRITSKI, 2003).

A diversidade de formas do aparelho bucal está relacionada tipo de forrageamento e, conseqüentemente, ao nicho de cada grupo, a grande maioria dos peixes desta família apresenta hábito onívoro, utilizando principalmente invertebrados, vegetais, frutos e sementes como base da sua alimentação; no entanto, eles apresentam uma forte tendência à herbivoria (SANTOS, 1982; ALVIM; PERET, 2004).

As espécies de anostomídeos são encontradas em diferentes ambientes, desde pequenos igarapés a grandes rios, além de lagos e lagoas. Nos rios, eles podem ser encontrados nas margens e no canal principal, tanto em águas rasas como profundas (SANTOS; JÉGU, 1987). Ainda, algumas espécies são encontradas somente em áreas de corredeiras (SANTOS; JÉGU, 1987; ZUANON, 1999).

### 2.1.1 Gênero *Megaleporinus*

*Megaleporinus* foi descrito recentemente com base em dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, incluindo dez espécies nominais: *Megaleporinus brinco*, *Megaleporinus conirostris*, *Megaleporinus elongatus*, *Megaleporinus garmani*, *Megaleporinus macrocephalus*, *Megaleporinus muyscorum*, *Megaleporinus obtusidens*, *Megaleporinus piavussu*, *Megaleporinus reinhardti* e *Megaleporinus trifasciatus*. Estas espécies eram alocadas anteriormente em *Leporinus* ou *Hypomasticus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

*Megaleporinus* é considerado um grupo monofilético, que compreende diferentes Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) dentro das dez espécies nominais, apenas *M. brinco*, *M. garmani* e *M. elongatus* apresentaram correspondência entre as espécies nominais e as MOTUs; *M. obtusidens* foi dividida em três MOTUs e as demais espécies em dois MOTUs, sugerindo a existência de biodiversidade críptica (SIDLAUSKAS; VARI 2008, RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017; RAMIREZ et al., 2017).

Referente à sua morfologia, os representantes de *Megaleporinus* são considerados relativamente grandes, os adultos geralmente atingem mais de 35 cm de comprimento padrão, destacando-se como um dos maiores representantes da família. Eles são caracterizados pela redução e formato dos dentes nos ossos da mandíbula, onde todas as espécies de *Megaleporinus* possuem três dentes unicúspides sobre os ossos pré-maxilares e dentais. O corpo pode apresentar de uma a quatro manchas escuras medianas, barras transversais escuras, faixas longitudinais escuras ou mais de quatro manchas escuras. O sistema de cromossomo sexual ZZ/ZW é exclusivo e confirmado para seis dos dez congêneres (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

### 2.1.2 Gênero *Leporinus*

O gênero *Leporinus* (Agassiz, 1829) é o mais especioso da família Anostomidae, com aproximadamente 80 espécies válidas, e um dos mais diversos na ordem dos Characiformes (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Sua distribuição geográfica é restrita à América do Sul (MENEZES et al., 2007).

As espécies pertencentes a este gênero apresentam uma grande diversidade na forma do corpo, a posição da boca, número de dentes e padrão de cor (BRITSKI; GARAVELLO, 1978). Possuem um corpo não muito alto e não comprimido, variando de sete cm a 50 cm de comprimento padrão (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). As espécies com de maior porte são exploradas na pesca comercial e na subsistência (GARAVELLO; BRITSKI, 2003).

Estudos morfológicos e moleculares classificam *Leporinus* como um gênero parafilético (SIDLAUSKAS; VARI, 2008; RAMIREZ et al., 2016). Dentre as espécies deste gênero, destaca-se, *Leporinus friderici* (Bloch 1794), a qual é amplamente distribuída pelas principais bacias hidrográficas sul-americanas (ALBRECHT; PELLEGRINI-CARAMASCHI, 2003). Em outra via, *L. friderici* compreende um clado monofilético e inclui um verdadeiro complexo de espécies onde em análises moleculares utilizando três genes nucleares e dois genes mitocondriais foram identificados oito MOTUs, recentemente diversificadas e oriundas de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (SILVA-SANTOS et al., 2018).

### 2.1.3 Gênero *Leporellus*

O gênero *Leporellus* (Lütken, 1874) é considerado o gênero basal na família Anostomidae (SIDLAUSKAS; VARI, 2008). Atualmente possui quatro espécies: *Leporellus cartledgei*, *Leporellus pictus*, *Leporellus retropinnis* e *Leporellus vittatus* (FROESE; PAULY, 2019).

As espécies deste gênero apresentam quatro dentes assimétricos não cuspidados no pré-maxilar e no dentário; uma ou mais faixas escuras amplas que se estendem pela maioria dos lobos caudais (GÉRY, 1977; BRITSKI; SILIMON; LOPES, 2007).

A espécie *L. vittatus* apresenta uma porção dorsal da cabeça salpicada de pontos escuros e três listras longitudinais ao longo do corpo, que se prolongam até a nadadeira caudal, os peixes deste gênero podem atingir até 35 cm de comprimento padrão (BRITSKI; SILIMON; LOPES, 2007).

Resultados de mapeamento cromossômico realizadas com *L. vittatus* provenientes de três grandes bacias hidrográficas brasileiras (Amazonas, Paraná e São Francisco) sugerem que eles compreendam um complexo de espécies crípticas (AGUILAR; GALLETI JR, 2008).

## 2.2 DNA REPETITIVO

Os cromossomos eucarióticos são compostos por diferentes sequências de DNA, classificados como DNA de cópia única, compreendendo as sequências encontradas apenas uma vez em um genoma; e DNA repetitivo, que são sequências repetidas de algumas dezenas a milhões de vezes (SUMNER; 2003). Os DNAs repetitivos podem ser organizados em dois grupos principais: as repetições *in tandem*, que incluem as famílias multigênicas, os DNAs satélites, microsatélites, minissatélites. E as repetições dispersas, compreendendo os elementos transponíveis (TEs), que agrupam os transposons de DNA e retrotransposons (SUMNER, 2003; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

As sequências repetitivas são altamente dinâmicas e têm sido amplamente estudadas em diferentes táxons, contribuindo para um melhor entendimento de estruturas envolvidas na evolução de genomas, diversificação cariotípica, rearranjos cromossômicos, origem e diferenciação de cromossomos supranumerários e de cromossomos sexuais (CIOFFI; BERTOLLO, 2012).

### 2.2.1 Elementos repetidos *in tandem*

#### 2.2.1.1 Famílias multigênicas

As famílias multigênicas compreendem os genes ribossomais (rDNA) 45S e 5S, os genes de histonas, das globinas, dos RNAs transportadores e os genes de pequenos RNAs nucleares (snRNA), os quais apresentam atividade gênica essencial para a manutenção da genoma (NEI; ROONEY, 2005; CABRAL-DE-MELLO et al., 2012).

Os genes ribossomais 45S consistem nas unidades transcricionais codificantes de rRNA 18S, 5,8S e 28S, os quais correspondem às Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), estes três sítios estão separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), e flanqueados pelos espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2). O processo de transcrição do rDNA é realizado pela enzima RNA polimerase I (LONG; DAVID 1980; MARTINS, 2007).

A localização cromossômica dos sítios de rDNA 45S tem sido estudada nos peixes por intermédio da impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs), considerado um método indireto e no qual a prata se associa as proteínas nucleolares envolvidas com a atividade transcricional dos genes ribossomais (MILLER et al., 1976). De outra maneira, o rDNA 45S pode ser localizado diretamente na sequência de DNA, por meio da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), considerada uma técnica direta, e amplamente utilizada para mapear diferentes sequências de DNAs repetitivos (KASAHARA, 2009).

A família gênica correspondente ao rDNA 5S, codifica apenas rRNA 5S, o qual é transcrito fora do nucléolo pela enzima RNA polimerase III (LONG; DAVID, 1980). A unidade rDNA 5S compreende sequências codificantes de 120 pares de bases (pb), separadas umas das outras por espaçadores não transcritos de tamanho variável (NTS) (PENDÁS et al., 1994; GALETTI JR; MARTINS, 2004). Apesar da sequência do gene 5S rDNA ser altamente conservada, mesmo em diferentes espécies, as regiões NTS variam em tamanho e composição da sequência, devido possivelmente a processos de inversões, substituições de bases, deleções e presença de pseudogenes, tais características tornam a sequência do gene 5S rDNA interessantes para estudos evolutivos (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013).

Mapeamentos cromossômicos realizados com os genes rDNA 5S e 18S mostraram que eles podem ocorrer em sintenia (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017), colocalizados com outras sequências repetitivas (GLUGOSKI et al., 2018) e em alguns casos podem estar presentes nos cromossomos sexuais, como ocorre em *Characidium* (SCACCHETTI et al. 2015) e no gênero *Triportheus* (CIOFFI et al., 2017). É possível verificar, que as sequências rDNA são amplamente estudadas e têm fornecido dados que auxiliam no entendimento de processos evolutivos cromossômicos em muitos grupos de peixes (MARTINS, 2007).

A família multigênica representada pelos pequenos RNAs nucleares (snRNA – pequenos RNAs nucleares), são caracterizados em cinco tipos de RNA (U1, U2, U4, U5, U6), e juntamente com proteínas formam um o complexo ribonucleoprotéico, conhecido como maquinário spliceossomo, o qual está relacionado ao processo de splicing, que consiste na excisão dos íntrons da molécula precursora de RNA mensageiro (pré-mRNA) e junção dos éxons, formando assim, o RNAm ativo (NILSEN, 2003; MATERA; TERNS; TERNS, 2007).

Poucos estudos com localização *in situ* para o snRNA foram realizados na espécies de peixes e os dados disponíveis mostraram que os sítios de snRNA podem estar agrupadas em clusters ou dispersos pelos cromossomos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; GARCÍA-



SOUTO et al., 2015), além de estarem associadas as rDNA (MANCHADO et al., 2006) e aos cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014).

#### 2.2.1.2 DNAs satélites, minissatélites e microssatélites

Os DNA satélites são sequências altamente repetitivas, com cerca de 100 a 300 pb de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 100.000 cópias no genoma (SUMNER, 2003; MARTINS, 2007). Geralmente estas sequências formam grandes aglomerados, principalmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos, sendo os principais componentes das heterocromatinas (UGARKOVIĆ; PLOHL 2002). Alguns estudos relacionam o acúmulo de DNA satélites nas porções centromérica aos papéis estrutural e funcional do centrômero (SCHUELER et al., 2001). Outros estudos utilizam os DNA satélites para investigar a composição de cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais em algumas espécies de peixes (UTSUNOMIA et al., 2019).

Os microssatélites ou sequências de repetições simples (SSRs) são formados por sequências muito curtas, compostas de 1-6 pb, podendo ser classificados como mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos repetidos até centena de vezes (ELLEGREN, 2004). Eles são abundantes em todos os genomas eucarióticos e geralmente encontrados entre as regiões codificadoras de genes estruturais ou entre outras sequências repetitivas (TAUTZ; RENZ, 1984). Outras pesquisas demonstraram que certos microssatélites são funcionais e podem afetar a regulação gênica (KASHI; KING, 2006; GEMAYEL et al., 2010; SONAY et al., 2015); ou podem estar envolvidos em rearranjos cromossômicos (KAMALI et al., 2011), além de participarem da evolução de diferentes sistemas cromossômicos sexuais (LI et al., 2011, POKORNÁ; KRATOCHVÍL; KEJNOVSKÝ, 2011, TERCENIO et al., 2013, POLTRONIERI et al., 2014).

Os minissatélites ou número variável de repetições *in tandem* (VNTR) são sequências repetidas entre 10 e 100 pares de bases formando matrizes de cerca de 0,5 a 30kb, e geralmente são encontrados próximos ao telômeros (SUMNER, 2003). Os minissatélites são alvo de diversos estudos, uma vez que parecem estar envolvidos nos processos de conversão gênica, recombinação meiótica e sítios frágeis para quebras cromossômicas (SUTHERLAND; BAKER; RICHARDS, 1988; JEFFREYS, MURRAY, NEUMANN, 1998).

Adicionalmente aos DNA repetitivos *in tandem*, são encontradas as sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> (MEYNE; RATLIFF; MOYZIS, 1989). A localização *in situ* da sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> tem sido amplamente utilizada em peixes, revelando sítios

teloméricos intersticiais (ITS), o que indica a ocorrência de fusões e inversões cromossômicas. Estudos envolvendo estas sequências contribuem para o entendimento sobre a organização, a evolução macroestrutural de cariótipos, além de fornecer informações sobre as origens dos sistemas de cromossomos sexuais nos peixes (ABUÍN; MARTÍNEZ; SÁNCHEZ, 1996; CHEW et al., 2002; CIOFFI; BERTOLLO; 2010).

## 2.2.2 Elementos repetitivos dispersos

Os elementos repetitivos dispersos também denominados elementos transponíveis são caracterizados pela sua capacidade de se mover pelo genoma (VOLFF, 2006). Os TEs estão presentes na maioria dos organismos, representando cerca de 50% do genoma de *Homo sapiens* (homem), 60% do genoma de *Zea mays* (milho), 77% de *Rana esculenta* (rã) e 40% de *Mus musculus* (camundongo). Porém, também podem ser visualizados em organismos unicelulares, compondo 5% do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) e 0,3% de *Escherichia coli* (bactéria) (BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

De acordo com o sistema de Wicker et al. (2007), estes elementos repetitivos são classificados em duas classes principais TEs, baseado no seu mecanismo de transposição: classe I ou retrotransposon: elementos que se movem por transcrição reversa, através de um intermediário de RNA; e classe II ou DNA transposons: elementos com capacidade de excisão do seu local original e inserção em outro lugar no genoma.

Independente da classe do elemento transponível, o processo de transposição dos TEs, pode ocorrer de maneira autônoma, quando eles sintetizam as enzimas necessárias para sua transposição e, não autônomos, quando não possuem a capacidade de codificação, podendo ser auxiliados pelas enzimas dos autônomos durante a sua mobilidade (CAPY et al., 1998; HUA-VAN et al., 2011).

Os elementos retrotransposons (RTE-retrotransposable elements) são compostos pelas ordens: LTR (longas repetições terminais), LINE (elementos nucleares intercalados longos), SINE (elementos nucleares intercalados curtos), DIRS (sequência de repetição intermediária de *Dictyostelium*) e PLE (elementos semelhantes a Penelope) (WICKER et al., 2007).

O processo de retrotransposição inicia com a transcrição de uma sequência alvo do DNA em uma molécula de RNA, esta molécula codifica a enzima transcriptase reversa, que por sua vez faz a transcrição do intermediário de RNA para DNA, posteriormente ocorre a síntese da molécula de DNA complementar e a sua inserção na nova posição na cadeia

completa de DNA, por meio da enzima integrase. Desta forma, os RTEs são copiados de seu local de origem, mantendo o sítio doador intacto, resultando na duplicação uma determinada sequência. Devido ao seu mecanismo de transposição, os RTE também são denominados "copia e cola" (BÖHNE et al., 2008).

Os transposons de DNA são diferenciados pelo número de fitas de DNA que são cortados durante a transposição, nas ordens dos Transposons de repetição invertida terminal (TIR) e elementos de Crypton, ambas as fitas de DNA são clivadas do seu sítio original e inseridas em um novo sítio do DNA, e a transposição segue o mecanismo de "corta e cola". Nas ordens que compreendem os Helitrons e o Maverick, ocorre a excisão de apenas uma das fitas e a transposição segue o mecanismo de "copiar e colar", a sequência original permanece no local e a sequência copiada é inserida em um novo lugar do genoma (WICKER et al., 2007).

Os TEs apresentam uma grande variedade de estrutura, tamanho e mecanismos de transposição, desta forma, representam poderosos impulsionadores da diversidade de espécies de diferentes organismos (CHALOPIN; VOLFF, 2017; SOTERO-CAIO et al., 2017).

Vários TEs pertencentes a diferentes classes foram identificados nos peixes teleósteos, a exemplo dos três elementos RTE (*Rex1*, *Rex3* e *Rex6*), os quais estão amplamente distribuídos e são específicos dos genomas de teleósteos (par uma revisão ver CARDUCCI et al., 2018). Além dos elementos *Rex*, outros TEs foram identificados em peixes, como o Tc1-Mariner (SCHEMBERGER et al., 2016), LINES, (Helitron, hAt, Zisupton) e SINES (PiggyBac e Gypsy) (BOER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2003; COCCA; IORIO; CAPRIGLIONE, 2011; ZHOU, 2012; BARBOSA et al., 2015; CAO et al., 2016; GLUGOSKI et al., 2018).

Os TEs representam uma fração considerável do genoma e devido a este fato tiveram uma influência significativa na sua evolução, através de seu envolvimento nos rearranjos cromossômicos, na diferenciação sexual dos cromossomos, além de gerar sítios para crossing-over desigual e para recombinação ectópica, estabelecer ponto suscetíveis à quebra do DNA, dentre outros (CANAPA et al., 2015; CHALOPIN et al., 2015; SCHEMBERGER et al., 2016; GLUGOSKI et al., 2018).

### 2.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA ANOSTOMIDAE: ÊNFASE NOS DNAS REPETITIVOS

Estudos citogenéticos com anostomídeos vêm sendo realizados desde a década de 70 e todos revelam a estrutura cariotípica composta por  $2n=54$  cromossomos, com morfologia metacêntrica (m) e submetacêntrica (sm), e número fundamental de 108 (GALETTI JR et al. 1981a, 1984; VENERE; GALETTI JR, 1986a; OLIVEIRA et al., 1988; GALETTI JR, FELDBERG, 2017).

O conservadorismo da estrutura cariotípica quanto ao número diploide foi verificado para espécies pertencentes a diferentes gêneros de Anostomidae: *Abramites* (FENOCCHIO et al., 2003), *Anostomus* (OJIMA; HAYASHI; UENO, 1976; MARTINS; GALETTI JR, 2000), *Laemolyta* (CABRAL; FELDBERG; PORTO, 1995; VENERE, 1998), *Leporellus* (AGUILAR; GALETTI JR, 2008; KRINSKI; MIYAZAWA, 2013; DULZ et al., 2019), *Leporinus* (SCHEEL, 1973 ; GALETTI JR et al., 1981a, 1984; VENERE; GALETTI JR, 1986a; 1986b; CABRAL; FELDBERG; PORTO, 1995; VALENTIM et al., 1996; KOEHLER et al., 1997; VENERE, 1998; FENOCCHIO et al., 2003; DULZ et al., 2019). *Megaleporinus* (PARISE-MALTEMPI et al., 2007, BARROS, GALETTI JR, FELDBERG, 2017; RAMIREZ, BIRINDELLI, GALETTI JR, 2017) *Pseudanos* (CABRAL; FELDBERG; PORTO, 1995), *Schizodon* (GALETTI JR et al., 1984; VENERE; GALETTI JR, 1986b; MESTRINER; GALETTI JR, 1987; MARTINS; GALETTI JR, 1997; PASTORI; FENOCCHIO; LÓPEZ, 1997; FENOCCHIO et al., 2003).

Apesar da aparente estabilidade cariotípica no que se refere ao  $2n$ , os anostomídeos apresentam diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (MOLINA; SHIBATTA; GALETTI JR, 2008). Algumas espécies possuem maior quantidade de heterocromatina nas regiões teloméricas e pericentroméricas da maioria dos cromossomos, além de bandas intersticiais para alguns cromossomos (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995, BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017). Em outras espécies, a heterocromatina ocorre em menor quantidade (ARTONI et al., 1999; KRINSKI; MIYAZAWA, 2013) ou está em quantidade bem reduzida (GALETTI JR; CESAR; VENERE, 1991). Além disto, as heterocromatinas podem ser coincidentes com a localização das RONS, e sequências de DNAs ribossômicos (GALETTI JR; CESAR; VENERE, 1991; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; KOEHLER et al., 1997; ARTONI et al., 1999, BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017).

A maioria das espécies de Anostomidae possuem RONS simples, posicionadas geralmente nas regiões terminais dos cromossomos, com variações interpopulacionais e interespecíficas, no que se refere a localização dos pares cromossômicos (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017). Poucas espécies têm RONS múltiplas (GALETTI Jr; LIMA; VENERE, 1995).

Mapeamento cromossômico utilizando as famílias gênicas, principalmente dos genes ribossomais rDNA 5S e 18S, tem sido amplamente empregada em análises de citogenética molecular. Análises realizadas em espécies de *Leporinus* revelaram sítio de rDNA 5S menor e em posição centromérica, consistindo de unidades monoméricas de repetição de cerca de 900 pb separados por sequências não transcritas (NTS), denominadas NST-II, consideradas conservadas, e o outro sítio de rDNA 5S é maior e localizado subterminalmente, composto por monômeros de 200 pb, separadas pelas NTS-I que são consideradas variáveis. Resultados semelhantes para a localização de dois sítios do rDNA 5S foram obtidos para diferentes populações de *L. friderici* (DULZ et al., 2019). As diferenças encontradas para rDNA 5S podem caracterizar duas subfamílias de rDNA 5S, que possivelmente evoluíram independentemente no genoma (MARTINS, GALETTI JR, 1999, 2000, 2001a).

Em outros estudos, envolvendo representantes os gêneros *Laemolyta* e *Leporellus*, também foram observados dois sítios de rDNA 5S, porém, ambos os pares localizados em posição centromérica. Além disso, apenas um par de cromossomos contendo rDNA 5S foi verificado para os representantes dos gêneros *Leporinus*, *Rhytiodus*, *Schizodon* e *Leporellus* (AGUILAR; GALETTI JR, 2008; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019).

Grande parte dos anostomídeos apresenta apenas um sítio de rDNA 18S, geralmente em posição terminal no cromossomo, os quais são coincidentes com as RONS (*L. friderici*, *Leporinus fasciatus*, *Leporinus agassizi*, *Laemolyta taeniata*, *Leporellus vitattus*) (AGUILAR; GALETTI JR, 2008; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019). Entretanto, marcações múltiplas de rDNA 18S foram obtidas para *Rhytiodus microlepis* e *Schizodon fasciatus*, além da sentença entre rDNA 5S e 45S para algumas espécies (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017).

Estudos envolvendo a família gênica do snDNA são restritos a poucos grupos de peixes, entre os anostomídeos somente um trabalho foi realizado com snDNA U2, e revelou clusters em um par de cromossomos de tamanho médio (submetacêntrico) na região pericentromérica (PONZIO; PISCOR; PARISE-MALTEMPI, 2018).

A localização *in situ* dos elementos retrotransponíveis *Rex1*, foram analisados em diferentes espécies de anostomídeos, e evidenciaram clusters de forma dispersa ao longo de todos os cromossomos, adicionalmente a alguns sinais em posições terminais e intersticiais. Sinais de hibridização do elemento *Rex3* foram encontrados principalmente nas posições terminais na maioria dos cromossomos. E o elemento *Rex6* não foi detectado nos cromossomos para as espécies estudadas (SPLENDORE DE BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013).

Os elementos repetitivos *LeSpeI*, *LeSmaI* e *LeSpeII* foram isolados de *M. elongatus* e mapeados em diferentes anostomídeos sem sistema de cromossomos sexuais (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012). No entanto, somente *LeSpeII* mostrou sinal de hibridização, revelando um padrão disperso por todos os cromossomos (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012).

### 2.3.1 Estudos sobre DNAs repetitivos e cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus*

As espécies alocadas no gênero *Megaleporinus* apresentam macroestrutura cariotípica conservada, da mesma maneira que outros anostomídeos (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). No entanto, este gênero apresenta cromossomos sexuais diferenciados com heterogametia feminina (GALETTI JR et al., 1981a, 1981b, GALETTI JR; FORESTI, 1987; GALETTI; LIMA; VENERE, 1995; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

O gênero *Megaleporinus* é caracterizado por apresentar o sistema de cromossomo sexual ZW, com estudos citogenéticos em seis das suas dez espécies: *M. conirostris*, *M. macrocephalus*, *M. obtusidens*, *M. elongatus*, *M. reinhardti* e *M. trifasciatus* (GALETTI JR et al., 1981, GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; MOLINA; GALETTI JR, 1998; VENERE et al., 2004). A presença do sistema ZW é considerada uma sinapomorfia que sustenta o monofiletismo de *Megaleporinus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

O cromossomo W é do tipo subtelocêntrico e quase inteiramente heterocromático, apresentando-se destacadamente maior que o cromossomo Z (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; PARISE-MALTEMPI et al., 2007). Já o cromossomo Z é um submetacêntrico e possui apenas o terço distal do braço longo heterocromático (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; PARISE-MALTEMPI et al., 2007).

O processo de heterocromatização foi atribuído como primeiro passo para a diferenciação dos cromossomos sexuais ZW de *Megaleporinus* (GALETTI JR; FORESTI,



1986). O sistema ZW, provavelmente se desenvolveu através de adições de heterocromatina em um cromossomo Z indiferenciado, conduzindo ao processo de diferenciação do cromossomo W (GALETTI JR; FORESTI, 1986; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995). Estudos realizados por Molina e Galetti Jr (2007), revelaram poucas diferenças no padrão de replicação entre os cromossomos Z e W de espécies de *Megaleporinus*, confirmando que o processo de heterocromatização é, provavelmente, o maior responsável pela diferenciação dos cromossomos sexuais (GALETTI JR et al., 1981b).

Mapeamento cromossômico envolvendo os genes ribossômicos 5S foi realizado apenas em *M. elongatus* e *M. obtusidens*, revelando dois sítios, um localizado na região centromérica e outro na região terminal (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2001a). Já para *M. trifasciatus* foi detectado apenas um sítio de rDNA 5S colocalizado com rDNA 45S, enquanto o rDNA 45S tem sítios múltiplos nesta espécie (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017).

A família gênica snDNA U2 apresenta poucos estudos para os peixes e, entre os *Megaleporinus*, estão disponíveis dados somente para *M. elongatus* e *M. macrocephalus*, os quais apresentaram clusters em um único par de cromossomos submetacêntrico de tamanho médio, localizado na região pericentromérica, não foram evidenciados sinais de hibridização de snDNA U2 nos cromossomos sexuais (PONZIO; PISCOR; PARISE-MALTEMPI, 2018).

Estudos envolvendo a localização *in situ* de microssatélites foram realizados em *M. elongatus*, *M. conirostris*, *M. obtusidens* e em *M. reinhardti*. As quatro espécies apresentaram acumulados de microssatélites nas regiões teloméricas dos cromossomos autossomos e do cromossomo Z (POLTRONIERI et al., 2014). O cromossomo W apresentou acúmulo preferencial de microssatélites nas regiões heterocromáticas, mostrando padrões de distribuição distintos para as sequências dos diferentes tipos de microssatélites. Estes resultados revelaram que os microssatélites seguiram diferentes trajetórias evolutivas em cada espécie, o que indica uma alta plasticidade para a diferenciação dos cromossomos sexuais (POLTRONIERI et al., 2014).

O mapeamento cromossômico envolvendo os elementos retrotransponíveis *Rex* foi realizado nas espécies *M. elongatus*, *M. macrocephalus* e *M. obtusidens* e revelou agrupamentos de *Rex1* e *Rex3* nas regiões terminais dos cromossomos, em posição intersticial no braço longo (q) dos cromossomos W, além de acúmulo diferencial de *Rex3* no braço q do W, entre as espécies (SPLENDORE de BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013).

A aplicação destes elementos retrotransponíveis também foi realizada em *M. trifasciatus*, revelando marcações de *Rex1* nas regiões terminais, centroméricas e

pericentroméricas dos cromossomos autossomos. Nos cromossomos sexuais foram evidenciadas as marcações por todo o braço longo dos cromossomos W e Z. O elemento *Rex3* foi detectado apenas nas regiões terminais dos autossomos, enquanto nos cromossomos sexuais apresentaram sinais em posição terminal e em regiões intersticiais do braço longo (BARROS, 2017).

Alguns elementos repetitivos foram identificados para o gênero *Megaleporinus*, como é caso de *LeSpeI*, *LeSmaI* e *LeSpeII* obtido a partir de *M. elongatus* com a utilização de enzimas de restrição (PARISE-MALTEMPI et al., 2007). O mapeamento cromossômico do *LeSpeI* revelou para as fêmeas marcações no braço longo do cromossomo W e no par de cromossomos autossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo (RONs). Nos machos, o sinal foi restrito à região pericentromérica dos cromossomos portadores das (RONs). Com estes resultados Parise-Maltempi et al. (2007) sugeriram o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ( $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ ), para *M. elongatus*, tais resultados foram confirmados em estudos posteriores (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012).

Em estudos envolvendo outras espécies de anostomídeos mostraram sinais de hibridações positivas de *LeSpeI* apenas no cromossomo W das espécies *M. macrocephalus* e *M. obtusidens* (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012). Foram localizados três blocos bem evidentes no braço longo do W, semelhante ao encontrado para *M. elongatus*, entretanto, nos demais cromossomos nenhum sinal foi detectado, independente do sexo analisado (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012). A aplicação desta sonda para espécies sem cromossomos sexuais não detectou nenhum sinal de hibridização (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012).

O mapeamento utilizando o elemento *LeSmaI* juntamente com rDNA 18S revelou para fêmeas e machos de *M. elongatus* sinais fluorescentes colocalizados no par cromossômico portador rDNA 18S (SILVA; BUSO; PARISE-MALTEMPI, 2013). Este elemento foi mapeado em outros anostomídeos com e sem sistema de cromossomos sexuais, no entanto, nenhum sinal de *LeSmaI* foi observado (SILVA; BUSO; PARISE-MALTEMPI, 2013). Tais resultados confirmaram o sistema de cromossomos sexuais múltiplos para *M. elongatus*, que é exclusivo para esta espécie (SILVA; BUSO; PARISE-MALTEMPI, 2013).

A localização *in situ* com o elemento *LeSpeII* em *L. elongatus* revelou sítios dispersos em quase todos cromossomos do complemento, exceto nos cromossomos sexuais



(SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012). Em *M. macrocephalus* e *M. obtusidens* foram encontrados sinais LeSpeII dispersos em todos os cromossomos sem indicação de especificidade sexual (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012).

Outra técnica empregada na investigação dos cromossomos sexuais é a pintura cromossômica, utilizando como sonda o cromossomo W microdissectado. Estudos envolvendo os cromossomos W de *M. elongatus*, *M. macrocephalus* e *M. obtusidens* e posteriormente hibridizada entre as espécies de anostomídeos com e sem sistema de cromossomos sexuais diferenciados, evidenciaram marcação nos cromossomos W das fêmeas pertencentes às espécies estudadas, sugerindo uma origem comum dos cromossomos sexuais para *Megaleporinus*. Nas espécies sem sistema sexual não foram evidenciadas marcações (PARISE-MALTEMPI et al., 2013).

Estudos recentes envolvendo sequenciamento do genoma da uma fêmea de *M. elongatus* e posteriores análises de bioinformática possibilitaram o isolamento de 69 variantes de DNAs satélites. Foram mapeadas 16 variantes de DNAs satélites através de hibridação *in situ* fluorescente em *M. elongatus* e *M. macrocephalus*, o resultado revelou o compartilhando conteúdo repetitivo nos cromossomos W das espécies analisadas, mas com diferentes padrões de clusterização, tanto para o número de cópias quanto para a localização cromossômica. Estes achados demonstraram que diferentes processos de acumulação ocorrem nas mesmas sequências repetitivas em eventos posteriores a sua origem (CREPALDI, 2019).

Um estudo semelhante utilizando sequenciamento do genoma de *M. macrocephalus* identificou uma maior abundância de DNAs satélites, foram caracterizados 164 famílias de DNAs satélite em *M. macrocephalus*, considerada a espécie mais rica em satélites descoberta até hoje. Posteriormente, foi realizado o mapeamento cromossômico (FISH) de 30 satélites, em *M. macrocephalus* e *M. obtusidens*, revelando que ambas as espécies compartilham dez DNAs satélites, estes resultados mostram que alguns satélites são conservados nos cromossomos W de *M. macrocephalus* e *M. obtusidens*, o que sugere que eles estavam presentes nestes cromossomos antes da divisão dessas espécies. Por outro lado, há satélites com acumulação diferencial ou exclusivo do cromossomo W de *M. macrocephalus*, corroborando com a ocorrência de uma diferenciação independente e contínua dos cromossomos W neste gênero (UTSUNOMIA et al., 2019).

## 2.4 CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS

Os peixes representam um grupo bastante diversificado de espécies, destacando-se entre os vertebrados por ser o mais especioso, atualmente possuem com 35.122 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2019). Deste valor, aproximadamente 19.000 espécies vivem em água doce, das quais cerca de 9.100 espécies são encontradas na Região Neotropical, a qual é considerada deter a ictiofauna mais rica do mundo (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016, REIS et al., 2016; ESCHMEYER; FONG, 2019).

Adicionalmente a diversidade de espécies, este grupo apresenta uma ampla diversidade cromossômica no que se refere a número diploide, presença de poliploidia, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009). Tais características os tornam interessantes modelos para estudos genéticos e evolutivos.

Os cromossomos sexuais dos peixes, possivelmente tiveram a sua origem relacionada a um de par autossômico, onde um dos homólogos em um determinado momento passou a apresentar um locus de determinação do sexo (LDS) (CHARLESWORTH, 1991). A interação do LDS com outros genes sexualmente antagonistas através de pressão seletiva levou a redução de recombinação neste local do par de cromossomos sexuais proto-X e proto-Y (CARVALHO, 2002, BACHTROG, 2006). Desta forma, permitindo a acúmulo de sequências repetitivas próximas a região sexo-específica de macho (Y/W), resultando na redução da similaridade de sequências entre os cromossomos proto-X e proto-Y (para uma revisão ver CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005).

As consequências da perda parcial da recombinação em regiões sexo-específico favoreceram a ocorrência de mutações adicionais, a amplificação de sequências de DNA repetitivo e o acúmulo de heterocromatina no cromossomo, possibilitando a contínua diferenciação morfológica do cromossomo heteromórfico (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005; BACHTROG, 2006).

A maioria das espécies de peixes não apresentam sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, outros possuem cromossomos sexuais em estágios iniciais de diferenciação até altamente diferenciados, incluindo diversos sistemas simples ou múltiplos (CIOFFI et al., 2012; YANO et al. 2016; NASCIMENTO et al., 2018, BARROS et al., 2018).

O sistema cromossômico altamente diferenciado pode ser detectado quando são observadas diferenças de tamanho, conteúdo gênico ou quantidade de sequências heterocromáticas. Define-se como ZW um sistema em que a fêmea é heterogamética e XY um

sistema em que o macho é heterogamético (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, et al., 2005)

O sistema simples ZZ/ZW é considerado o mais frequente entre as espécies de peixes neotropicais, ocorrendo nas espécies do gênero *Megaleporinus* (Anostomidae), em representantes das famílias Characidae, Crenuchidae, Gasteropelecidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Loricariidae, Sternopygidae, Poeciliidae. Existem diferentes graus de heteromorfismo, como é o caso das espécies do gênero *Megaleporinus* e algumas espécies de Parodontidae, onde o cromossomo W é notavelmente maior que o cromossomo Z, no gênero *Triportheus* ocorre o contrário, o cromossomo Z é maior que o W. Os cromossomos sexuais ainda podem ser homomórficos (para uma revisão ver CIOFFI et al., 2012).

O outro sistema simples é o XX/XY, presente em poucas espécies das famílias Erythrinidae, Ancistrinae, Loricariidae, Pimelodidae, Sternopygidae, Poeciliidae e Eleotrididae (para uma revisão ver CIOFFI et al., 2012). Nas espécies portadores do sistema XY, os cromossomos sexuais ainda são pouco diferenciados e sem um evidente acúmulo de heterocromatina (CIOFFI; BERTOLLO, 2010).

Algumas espécies ainda podem apresentar sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, como *Megaleporinus elongatus* ( $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ ) identificado a partir de mapeamento de elementos repetitivos (PARISE-MALTEMPI et al., 2007), *Hoplias malabaricus* ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) e ( $XX/XY_1Y_2$ ) apresenta distintos estágios evolutivos dos cromossomos sexuais (BERTOLLO et al., 1997, 2000), em *Erythrinus erythrinus* ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) o cromossomo Y metacêntrico grande foi originado a partir de uma fusão cêntrica de pares acrocêntricos (BERTOLLO et al., 2004; CIOFFI et al., 2010). Em *Apareiodon affinis*, a origem do mecanismo ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> está relacionada com rearranjos cromossômicos (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR, 1980) e DNAs repetitivos (SCHEMBERGER et al., 2011).

Estudos evolutivos relataram que os cromossomos sexuais em alguns grupos de peixes podem ter uma origem comum ou ocorrer de forma independente. Por exemplo, o sistema ZW de *Megaleporinus* evidencia uma origem comum, visto que todas as espécies possuem Z e W com a mesma morfologia, inclusive o mesmo padrão de distribuição de heterocromatina, além do compartilhamento de diversas sequências repetitivas (POLTRONIERI et al., 2014; BARROS et al., 2018).

Por outro lado, o gênero *Eigenmannia* possui diferentes sistemas de determinação sexual entre as suas espécies (XX/XY), ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) e (ZZ/ZW), e o mapeamento cromossômico utilizando cromossomos sexuais inteiros como sondas obtidas por

microdissecção sugeriram uma origem independente (HENNING et al., 2008; 2011). Possivelmente a divergência do XY ocorreu da heterocromatinização, e a origem do sistema múltiplo está relacionada a rearranjos cromossômicos, como verificado para outros grupos com sistemas múltiplos (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR, 1993; HENNING et al., 2008; 2011).

Diante desta diversidade de sistemas sexuais vários estudos têm sido realizados com o objetivo entender como ocorreram os seus processos de origem e diferenciação nos peixes neotropicais. Estes estudos utilizam sequências de DNAs repetitivos em suas análises, realizadas principalmente por hibridização *in situ* fluorescente. Diversas classes de DNAs repetitivos já foram identificados nos cromossomos sexuais, como DNAs ribossomais (PUCCI et al., 2014; SCACCHETTI et al., 2015; CIOFFI, et al., 2017), snDNA U1 e U2 (UTSUNOMIA et al., 2014, SCACCHETTI et al., 2015; SILVA et al., 2015; PONZIO; PISCOR; PASQUALI PARISE-MALTEMPI, 2018) DNAs satélites (VICENTE et al., 2003; UTSUNOMIA, 2019), microsatélites (POLTRONIERI et al., 2014; ZIEMNICZAK et al., 2014; PUCCI et al., 2016; GETLEKHA et al., 2018) e elementos transponíveis (SPLENDORE DE BORBA; LOURENÇO DA SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013; SCHEMBERGER et al., 2014, 2016; CARDUCCI et al., 2018).

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A família Anostomidae tem sido amplamente estudada citogeneticamente, revelando uma macroestrutura cariotípica conservada quanto ao número diploide (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017). No entanto, diferentes padrões na distribuição da heterocromatina constitutiva podem ser observados nos cariótipos, destacando-se em maior quantidade nos cromossomos sexuais (PARISE-MALTEMPI et al., 2007). A heterocromatina representa uma porção substancial dos genomas eucarióticos e é composta principalmente por sequências repetitivas *in tandem*, tais como os DNAs satélites, minissatélites e microsatélites, e também pode ser enriquecida por elementos repetitivos dispersos, como os transposons e retrotransposons (SUMNER, 2003).

Estudos envolvendo localização *in situ* de diferentes classes de DNAs repetitivo revelaram que cromossomos sexuais de *Megaleporinus* são compostos por várias sequências repetitivas, no entanto, muitas delas ainda permanecem desconhecidas, ou restritas a poucas espécies. Desta forma, a identificação, caracterização e mapeamento de elementos repetitivos são indispensáveis para uma melhor compreensão da diversificação cariotípica entre anostomídeos, e do processo de origem, diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em *Megaleporinus*.

#### OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo analisar o papel dos DNAs repetitivos no processo de diversificação cariotípica dos anostomídeos, além de avaliar a participação destes DNAs na origem e diferenciação dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a macroestrutura cariotípica de populações/espécies de *Leporinus*, *Leporellus* e *Megaleporinus*;
- ✓ Analisar comparativamente a distribuição dos rDNA e RTE *RexI* nas populações/espécies de *Leporinus* e *Leporellus*;
- ✓ Inferir sobre a diversificação cariotípica de *Megaleporinus* com base na distribuição das famílias multigênicas (rDNA e snRNA);

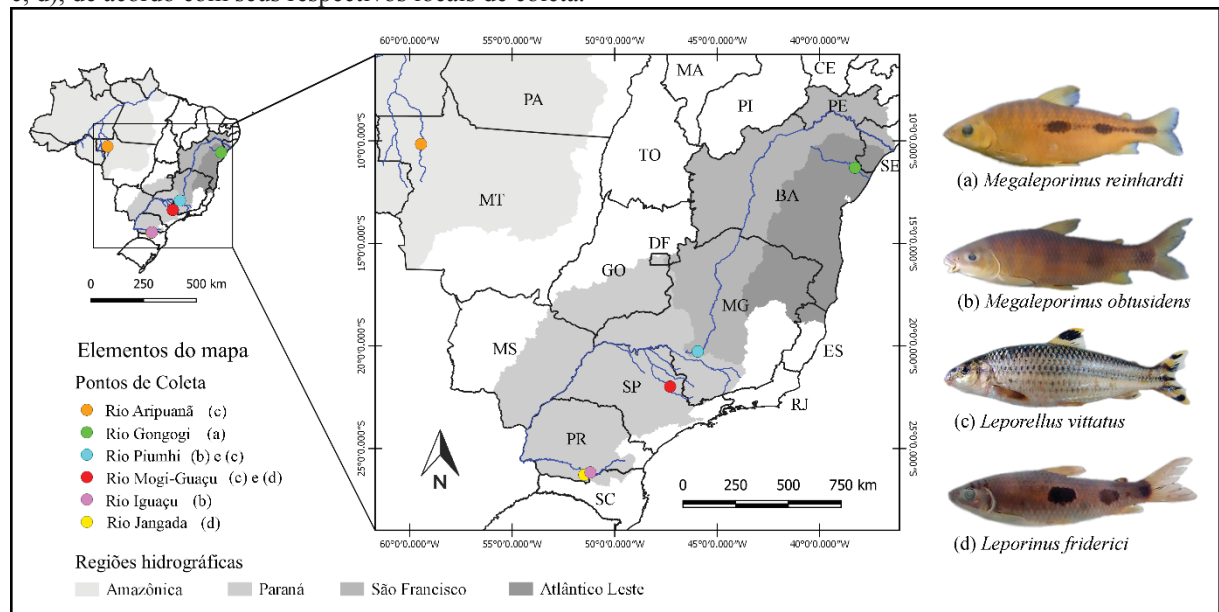
- ✓ Relacionar a presença de diferentes elementos repetitivos *in tandem* (rDNA, snDNA, microssatélites e sequências teloméricas) e de TEs (*Rex1*, *Rex3*, Gypsy) com o processo de origem e diferenciação cromossomos sexuais de *Megaleporinus*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PONTOS DE COLETA

O material biológico utilizado neste estudo foi obtido de espécimes de peixes da família Anostomidae (*Leporinus friderici*, *Leporellus vittatus*, *Megaleporinus obtusidens* e *Megaleporinus reinhardti*) capturados de 6 rios pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras (FIGURA 1). A localização detalhada dos pontos de coleta está descrita na tabela 1 (APÊNDICE 1).

FIGURA 1 - Mapa do Brasil com destaque para as bacias hidrográficas Amazônica, do Paraná, São Francisco e Atlântico Leste, evidenciando os rios e os pontos de coletas. À direita as espécies estudadas denominadas (a, b, c, d), de acordo com seus respectivos locais de coleta.



FONTE: O Autor (2019)

A coleta dos espécimes foi autorizada pela licença permanente para coleta de material zoológico (MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) (ANEXO 1). Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa (Protocolo: 11/2017) (ANEXO 2). Os espécimes de *Leporinus friderici*, *Leporellus vittatus* e *Megaleporinus obtusidens* foram identificados por especialistas da coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá. Já *Megaleporinus reinhardti* foi identificado por especialistas na Universidade Estadual Paulista, Campus Júlio Mesquita Filho.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Análise cromossômica convencional

Os espécimes coletados foram mantidos em aquários aerados e submetidos a um processo inflamatório para induzir o número de células em divisão conforme descrito por Cavallini; Bertollo (1988) (ANEXO 3). Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978), com modificações de BLANCO et al. (2012) (ANEXO 4). Posteriormente, as preparações cromossômicas em lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato pH = 6,8 (ANEXO 5). A detecção de heterocromatina foi de acordo com Sumner (1972) com modificações (LUI et al., 2009) (ANEXO 6).

### 4.2.2 Extração de DNA e amplificação das de sequências

O DNA genômico foi extraído a partir de tecidos do fígado de espécies de *Megaleporinus obtusidens* utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com Doyle e Doyle (1990) (ANEXO 7). A amplificação das sequências dos rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1, snRNA U2, *Rex1*, *Rex3*, Gypsy, (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub> ocorreram por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação geral para cada sequência consistiu de: 100ng de DNA molde, 1x tampão da reação (200mM Tris, pH 8.4, 500mM KCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 1U Taq DNA-polimerase (5U/μl). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. Os primers utilizados nas amplificações por PCR estão descritos na tabela 2 (APÊNDICE 2).

### 4.2.3 Purificação, sequenciamento e análise das sequências

Após as reações de amplificação, o produto das PCRs do rDNA 5S, rDNA 18S e *Rex1* foram purificados usando GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich) (ANEXO 8) e submetidas ao sequenciamento nucleotídico em equipamento ABI-PRISM Genetic Analyzer (Carlsbad, CA). Os produtos dos sequenciamentos nucleotídicos foram editados e analisados usando o software GENEIOUS 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). As identidades das sequências foram confirmadas usando o BLASTn (NCBI) e CENSOR para sequências repetitivas



(KOHANY et al., 2006). Finalmente, as sequências foram depositadas no GenBank (MH697559, MH701851 e MH684488).

#### 4.2.4 Marcação de sondas

As sequências de rDNA 18S, snRNA U1, *Rex1* foram marcadas usando o composto digoxigenina 11-dUTP com o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante. As sequências de *Rex3* e *Gypsy* foram marcadas com biotina 11-dUTP utilizando o kit BIO-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) (ANEXO 9). Já as sequências do rDNA 5S e snRNA U2 foram marcadas por PCR, em reação similar a descrita acima, porém com acréscimo de 0,06 mM de biotina 16-dUTP. As sequências (TTAGGG)<sub>n</sub> e (GATA)<sub>n</sub> foram marcadas por PCR com digoxigenina 11-dUTP de acordo com o descrito em Traldi et al. (2013). As sequências dos microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub> foram marcadas com digoxigenina em sua extremidade 5' durante sua síntese (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

#### 4.2.5 Hibridação *in situ* Fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o procedimento descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986) (ANEXO 10). O protocolo foi realizado sob alta condição de estringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 42°C por 16 h). Para a detecção de fluorescência foram utilizados 4 μg/mL de Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e 10 μg/mL de anti-digoxigenin rhodamine (Roche Applied Science), os quais foram incubados a 37 °C por 1 hora no tampão de detecção [4x SSS, 0.2% (v/v) Tween 20, 5% (v/v) de leite em pó desnatado]. Os cromossomos foram contracorados com 0,2 μg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

#### 4.2.6 Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Lab 1 acoplado ao software Zen Lite em Câmera Zeiss AxioCam ICM1, resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Os cariótipos foram organizados usando o

software Adobe Photoshop, versão CS6 e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão organizados em três capítulos que correspondem aos artigos científicos:

### 5.1 CAPÍTULO I

COMPARATIVE CYTOGENETICS AMONG *Leporinus friderici* AND *Leporellus vittatus* POPULATIONS (CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE): FOCUS ON REPETITIVE DNA ELEMENTS

### 5.2 CAPÍTULO II

INFERÊNCIAS SOBRE DIVERSIFICAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Megaleporinus* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) COM BASE NA DISTRIBUIÇÃO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS

### 5.3 CAPÍTULO III

EVIDÊNCIAS DA ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DE *Megaleporinus obtusidens* E *Megaleporinus reinhardti* (CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE)

## 5.1 CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista Comparative Cytogenetics

CompCytogen 13(2): 1–16 (2019) doi: 10.3897/CompCytogen.v13i2.33764

### **Comparative cytogenetics among *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements**

Thais Aparecida Dulz<sup>1,2</sup>, Carla Andreia Lorscheider<sup>2</sup>, Viviane Demetrio Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Bueno Noletto<sup>2</sup>, Orlando Moreira-Filho<sup>3</sup>, Viviane Nogaroto<sup>4</sup>, Marcelo Ricardo Vicari<sup>1,4</sup>

**1** Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná State, Brazil **2** Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, Praça Coronel Amazonas, s/nº, 84600-185, União da Vitória, Paraná State, Brazil **3** Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo State, Brazil **4** Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil

#### **Abstract**

Abstract Anostomidae are a neotropical fish family rich in number of species. Cytogenetically, they show a conserved karyotype with  $2n = 54$  chromosomes, although they present intraspecific/interspecific variations in the number and chromosomal location of repetitive DNA sequences. The aim of the present study was to perform a comparative description of the karyotypes of two populations of *Leporinus friderici* Bloch, 1794 and three populations of *Leporellus vittatus* Valenciennes, 1850. We used conventional cytogenetic techniques allied to fluorescence *in situ* hybridization, using 18S ribosomal DNA (rDNA) and 5S rDNA, a general telomere sequence for vertebrates (TTAGGG)<sub>n</sub> and retrotransposon (RTE) *Rex1* probes. The anostomids in all studied populations presented  $2n = 54$  chromosomes, with a chromosome formula of  $32m + 22sm$  for *L. friderici* and  $28m + 26sm$  for *L. vittatus*. Variations in the number and location of the 5S and 18S rDNA chromosomal sites were observed between *L. friderici* and *L. vittatus* populations and species. Accumulation of *Rex1* was observed in the terminal region of most chromosomes in all populations, and telomere sequences were located just on all ends of the 54 chromosomes in all populations. The intraspecific and intergeneric chromosomal changes occurred in karyotype differentiation, indicating that minor chromosomal rearrangements had present in anostomid species diversification.

**Keywords:** Chromosomal differentiation, karyotype evolution, ribosomal DNA, retrotransposon

## Introduction

Eukaryotic chromosomes can be classified into different DNA classes: single copy DNA, which are sequences found only once in a genome; and repetitive DNA, which are sequences repeated from a few tens to millions of times (Sumner 2003). Repetitive DNA can be classified into tandem repeats (multigene families and satellite, minisatellite, and microsatellite DNA) and transposable elements (TEs): transposons and retrotransposons with dispersed distribution in genomes (Sumner 2003).

Satellite DNA and TEs are responsible for a large part of the structural and functional organization of genomes (Sumner 2003, Feschotte 2008), and carry sequences containing DNA double-strand break hotspots, resulting in chromosome/genome reshuffle (Eichler and Sankoff 2003, Longo et al. 2009, Farré et al. 2011, Barros et al. 2017, Glugoski et al. 2018). The movement of repetitive sequences within the genome promotes chromosomal differentiation, which has an important role on karyotype evolution (Wichman et al. 1991, Pucci et al. 2016, 2018, Lorscheider et al. 2018, Nascimento et al. 2018).

Anostomids are neotropical fishes with a high number of species and diverse morphology (Garavello and Britski 2003, Graça and Pavanelli 2007, Britski et al. 2012, Ramirez et al. 2017). Cytogenetically they present a conserved diploid number ( $2n$ ) of 54 chromosomes, with mostly metacentric (m) and submetacentric (sm) chromosomes (Galetti Jr and Foresti 1986, Galetti Jr et al. 1991, 1995, Venere et al. 2004). Anostomidae species present differentiated karyotypes regarding the distribution of heterochromatin and repetitive sequences, presenting different localizations of heterochromatic bands and repetitive DNA sites (Martins and Galetti Jr 1999, Parise-Maltempi et al. 2007, Porto-Foresti et al. 2008, Hashimoto et al. 2009, Marreta et al. 2012, Splendore de Borba et al. 2013).

Therefore, although they retain  $2n = 54$  chromosomes, anostomids present very high intra- and interspecific chromosomal/genetic variability, which is highly compatible with restricted gene flow (Parise-Maltempi et al. 2007, 2013, Ramirez et al. 2017; Ramirez, Birindelli, Galetti Jr, 2017; Silva-Santos et al. 2018). With the aim of better understanding the intra- and interspecific chromosomal differentiation due to accumulation of repetitive sequences, in the present study we performed a comparative evaluation of the karyotypes of two populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) and three populations of *Leporellus vittatus* (Valenciennes, 1850). Cytogenetic analysis was performed using Giemsa staining and C-banding, and chromosome mapping of repetitive DNAs using the ribosomal DNA (rDNA) 18S and 5S rDNA, the (TTAGGG) $n$  sequence and the retrotransposon (RTE) *Rex1*.

## Material and methods

Specimens of *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* were collected from rivers belonging to different Brazilian hydrographic basins (Table 1). Fish capture was authorized by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – license numbers 10538-1 and 15117-1) and the processing was performed in accordance with the Ethical Committee on Animal Use (CEUA 29/2016) of the Universidade Estadual de Ponta Grossa and current Brazilian legislation. The analyzed specimens were identified by taxonomists experts in the Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia) museum, Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Genomic DNA was extracted from the liver tissue, using the protocol of Doyle and Doyle (1990), from the *Megaleporinus obtusidens* (Ramirez, Birindelli, Galetti Jr, 2017), described first time in the literature as *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). The 18S rDNA amplification was performed using primers 18S Fw (5'-ccgctttggtgactcttgat-3') and 18S Rv (5'-ccgaggacctcactaaacca-3'), according to Gross et al. (2010). The 5S rDNA sequence was amplified using primers 5SA (5'-tcaaccaaccacaaagacattggcac-3') and 5S (5'-tagacttctgggtggccaaaggaatca-3'), according to Martins and Galetti (1999). The vertebrate telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> was obtained according to Ijdo et al. (1991). The non-long terminal repeats retrotransposon (non-LTR RTE) *RexI* sequence was obtained by PCR using primers RTX1-F1 Fw (5'-ttctccagtgcctcaacacc-3') and RTX1-R1 Rv (5'-tcctcagcagaaagagtctgctc-3'), according to Volff et al. (1999, 2000). The sequences of the 5S rDNA, 18S rDNA and *RexI* were analyzed and their nucleotide identities were confirmed using BLASTn (National Center for Biotechnology Information) and the CENSOR tool for repeated sequences (Kohany et al. 2006). Finally, the sequences were deposited in GenBank (Sequences ID: MH697559, MH701851, MH684488, respectively).

Mitotic chromosomes were obtained according to Blanco et al. (2012) and stained with 5% Giemsa in phosphate buffer, pH 6.8. Heterochromatin detection was performed according to Sumner (1972), with modifications (Lui et al. 2009).

The 18S rDNA was labeled with digoxigenin-11-dUTP, using the DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science), according to the manufacturer's recommendations. The 5S rDNA sequence was labeled with biotin 16-dUTP by PCR, and *RexI* and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences with digoxigenin-11-dUTP by PCR. PCR reactions were performed with 20 ng DNA template, 1× polymerase reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 μM dATP, dGTP and dCTP, 28 μM dTTP, 12 μM digoxigenin-11- dUTP or biotin 16 dUTP, 1 μM of

each primer and 1 U of DNA Taq polymerase. The PCR program consisted of an initial step of denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of 95 °C for 30 s, 56 °C for 45 s, 72 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 7 min.

The general protocol for FISH (Pinkel et al. 1986) followed under hybridization mixture (2.5 ng/μl probe, 50% formamide, 2×SSC, 10% dextran sulfate, at 37 °C for 16 h). Post-hybridization washes were performed in high stringency [50% formamide at 42 °C for 10 min (twice times), 0.1×SSC at 60 °C for 5 min (three times), and 4×SSC 0.05% Tween at room temperature for 5 min (two baths)]. Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and Anti-digoxigenin rhodamine fab fragments (Roche Applied Science) antibodies were used for probes detection. The chromosomes were stained with DAPI (0.2 μg/ml) in Vectashield mounting medium (Vector) and analyzed under epifluorescence microscopy.

Chromosome preparations were analyzed using the brightfield and epifluorescence microscope Zeiss Axio Lab 1, coupled to the Zeiss AxioCam ICM1 camera with the Zen Lite software and a resolution of 1.4 megapixels (Carl Zeiss). The karyotypes were organized and classified as metacentric (m) or submetacentric (sm) according to Levan et al. (1964).

## Results

All anostomids evaluated in the present study presented  $2n = 54$  chromosomes and a fundamental number (FN) of 108 (Table 1). The two populations of *L. friderici* (Mogi–Guaçu and Jangada rivers) presented a karyotype formula (KF) of  $32m + 22sm$  (Fig. 1a, b), and the three populations of *L. vittatus* (Mogi–Guaçu, Aripuanã and São Francisco rivers) a karyotype formula of  $28m + 26sm$  (Fig. 1c, d, e). Sex chromosome heteromorphism was not detected in the populations/species analyzed.

C-banding showed discrete blocks of centromeric heterochromatin for *L. friderici*, with very evident blocks in the terminal regions of the long arms of just one homologue of chromosomes 1 and 5 for the population of the Mogi–Guaçu river (Fig. 2a); and, in the subterminal regions of pairs 1 and 17 for the population of the Jangada river (Fig. 2b). *Leporellus vittatus* showed blocks of heterochromatin in the pericentromeric or proximal regions of most chromosomes (Fig. 2c, d), which was very evident for the populations from the Mogi–Guaçu and Aripuanã rivers and less evident for the populations from the São Francisco river (Fig. 2e).

Double-FISH using 5S and 18S rDNA probes detected one 45S rDNA site in the short arm (p) of chromosome pair 1 for both populations of *L. friderici* (Fig. 3a, b). The 5S

rDNA was located in the pericentromeric region of chromosome pair 10 and in the short arm (p) of pair 11 for *L. friderici* from the Mogi-Guaçu river (Fig. 3a), whereas it was located in the p arm of chromosome pairs 3 and 11 for *L. friderici* from the Jangada river (Fig. 3b). *Leporellus vittatus* from the Mogi-Guaçu river presented 45S rDNA in the terminal region of the long arm (q) of pair 5, and 5S rDNA was located in the proximal region of 3p pair (Fig. 3c). In *L. vittatus* from the Aripuanã river, the 45S rDNA was located in synteny with 5S rDNA in the chromosome pair 6, with terminal location 6q for 45S rDNA and proximal q arm site for 5S rDNA, and an additional 5S rDNA site in the proximal q arm of pair 8 (Fig. 3d). *Leporellus vittatus* from the São Francisco river presented the 45S rDNA in the terminal region of 6q, and the 5S rDNA in the proximal region of 3p (Fig. 3e). *In situ* mapping of RTE *Rex1* (Fig. 4a–e) and (TTAGGG)<sub>n</sub> (Fig. 5a–e) showed signals in the terminal regions of all chromosomes for all populations of both *L. friderici* and *L. vittatus*. In *L. vittatus* from the Mogi-Guaçu river, the telomeres signals were tiny in all metaphases analyzed (Fig. 5c).

## Discussion

The present cytogenetic analysis confirmed the conservation of the karyotype macrostructure of  $2n = 54$  chromosomes in *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus*, with metacentric and submetacentric chromosomes (FN=108). This karyotype structure is shared by most species belonging to Anostomidae (Galetti Jr et al. 1995, Venere et al. 2004). In addition, *L. friderici* and *L. vittatus* presented small differences in their karyotype formulas resulted of the chromosome rearrangements such as pericentric inversions, translocations or centromere repositioning, which alters the chromosome morphology without any accompanying chromosomal rearrangements (Rocchi et al. 2012).

Some chromosomal markers presented some differentiation within and between species of anostomids. Intraspecific variations were observed in the chromosomal location and quantity of heterochromatin blocks, which were mainly located in pericentromeric regions in *L. vittatus* and terminal positions of chromosomes in *L. friderici*. These heterochromatin distribution in the chromosomes have also been observed for other anostomids (Pereira et al. 2002, Aguilar and Galetti Jr 2008, Barros, Galetti Jr, Feldberg 2017). Satellite DNA is one of the components of heterochromatin, which is also enriched in other dispersed repeated elements, including transposons (Mazzuchelli and Martins 2009, Vicari et al. 2010). It is usually accepted that the number of repetitive copies of a heterochromatin block may increase through mechanisms of homologous recombination, TEs



invasion, or replication slippage for microsatellite expansion inside heterochromatin (Gray 2000, Kante et al. 2009, Kelkar et al. 2011, Glugoski et al. 2018). These mechanisms may play a role in the microstructural differentiation of heterochromatin chromosome blocks once no evident large heterochromatic blocks were observed in anostomids species analyzed.

*In situ* location of ribosomal genes showed that these sites were also involved in the chromosomal changes, especially in the studied *L. vittatus* populations. The location of rDNA in different positions and number of chromosomal sites also supports the hypothesis of population differentiation. On the other hand, the location of rDNA sites was observed to be highly conserved in the karyotypes of some anostomids (Martins and Galetti Jr 1999, 2000, 2001b). In the present study, consistent differences in the location of rDNA sites were observed between the *L. vittatus* populations evaluated. These differences are exclusive conditions due to population isolation and contribute to genomic diversification in this fish group.

Anostomids usually present only one pair of 45S rDNA (Martins and Galetti Jr 1999), being a common characteristic of this group. Previous studies observed polymorphisms in the number of 45S rDNA sites in *Leporinus taeniatus* Lütken, 1875, *Leporinus trifasciatus* Steindachner, 1876, *Rhytidodus microlepis* Kner, 1858 and *Schizodon fasciatus* Spix & Agassiz, 1829 (Barros, Galetti Jr, Feldberg 2017). In the present study, although this was also observed, differences in the chromosomal position of 45S rDNA were additionally observed between species, with signals in the terminal region of the p arm for *L. friderici* and in the q arm for *L. vittatus*. The rDNAs usually present high rates of karyotype rearrangements in evolutionary lineages (Symonová et al. 2013). These sequence movements within karyotypes have been proposed to occur by transposition and/or by transposon-mediated by TEs in a non-homologous recombination mechanism (Symonová et al. 2013, Barros et al. 2017, Glugoski et al. 2018). The *L. vittatus* specimens from the Aripuanã river presented synteny of 45S rDNA and 5S rDNA, in contrast with the specimens from the Mogi-Guaçu and São Francisco rivers and the *L. friderici* populations corroborating to high evolutionary chromosomal change level to rDNA sites. The rDNA synteny was also observed in other anostomids, such as *L. trifasciatus*, *S. fasciatus* and *Laemolyta taeniata* (Kner, 1858), showing that it is a recurrent chromosomal characteristic of this group (Barros, Galetti Jr, Feldberg 2017).

Recently, some studies have proposed that the dispersal of ribosomal sites and changes in their chromosomal location may affect recombination rates in these specific sites, and that these changes can lead to rapid genome divergence (Symonová et al. 2013).

Therefore, these populational chromosome rearrangements due to rDNA transposition could promote differentiation (Symonová et al. 2013, Pucci et al. 2014, Barbosa et al. 2017), which may lead to speciation, as observed in the present study for Anostomidae.

The chromosomal mapping of the non-LTR retrotransposon family Rex (*Rex1*, *Rex3* and *Rex6*) has been conducted in the genomes of different teleost species (Volff et al. 1999, 2000, Cioffi, Martins and Bertollo 2010, Valente et al. 2011, Splendore de Borba et al. 2013, Szczepanski et al. 2013, among others). Although they may have a dispersed distribution (Ozouf-Costaz et al. 2004), in most cases, they show strong association with heterochromatic regions (Cioffi, Martins and Bertollo. 2010, Valente et al. 2011). Overall, the accumulation of RTE sequences in the terminal region of chromosomes has been well documented in *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) and in *Sorubim lima* (Bloch & Schneider, 1801), a Neotropical catfish (Eickbush and Furano 2002, Szczepanski et al. 2013). The distribution of *Rex1* sequences in terminal regions of chromosomes in some species of Anostomidae was also detected by *in situ* mapping (Splendore de Borba et al. 2013). Transpositions and DNA repair by non-homologous recombination involving repetitive sequences in the terminal regions of chromosomes are common during the Rabl configuration of cell division (Schweizer and Loid 1987, Sumner 2003). Furthermore, an efficient strategy to limit the damage caused by retrotransposition in the host genome is to direct the insertion in fairly safe regions, poor in genes, for example in heterochromatin or at telomeres (Okazaki et al. 1995, Zou et al. 1996, Takahashi et al. 1997).

Telomere shortening is usually prevented by telomerase, a reverse transcriptase which adds telomeric repeats to the chromosome ends, thus elongating telomeres (Makarov et al. 1997). The phylogeny involving telomerases and retrotransposons was confirmed after the discovery of a group of retrotransposons, called elements like Penelope, which encodes reverse transcriptase (RT) directly related to an enzyme telomerase (Arkhipova et al. 2003). In *Drosophila*, retrotransposons protect the ends of chromosomes, due to the absence of telomerase, which was possibly lost during evolution (Biessmann et al. 1990). TEs can play a role in the reorganization of the genome being co-opted or exapted to form new genomic functions (Feschotte 2008). This observation suggests the versatility of RT activity in counteracting the chromosome shortening associated with genome replication and that retrotransposons can provide this activity in case of a dysfunctional telomerase. In anostomids analyzed, the (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence was detected in the chromosomal ends, indicating telomerase activity. The short telomere signals detected in *L. vittatus* from the Mogi-Guaçu population can be resulted of the somatic cells telomere shortens with each cell division or,

due to inconsistent FISH detection in short telomere sequences. Finally, we observed absence of an interstitial telomeric sequence (ITS), together with the conserved karyotype of  $2n = 54$  chromosomes, indicating that just non-Robertsonian events may play a role in karyotype diversification in the studied species.

The present study showed intraspecific karyotype variation in populations with isolation of gene flow, and interspecific variation between populations of *L. friderici* and *L. vittatus*. This can be partly explained by genome reorganization due to movement of heterochromatin blocks, ribosomal sites, satellite repetitive sequences, and transposable elements. Our results therefore confirm the conservation of the chromosome macrostructure and indicate karyotypic differentiation at the microstructural level during evolution in Anostomidae.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to the Ministério do Meio Ambiente / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA / ICMBio license numbers 10538-1 e 15117) for authorizing the capture of the fish species. The study received funding from the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES - Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

### **References**

As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se organizadas no final da tese.

Table 1. Cytogenetic data of *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* analyzed in the present study. SP = São Paulo State, PR = Paraná State, MG = Minas Gerais State, MT = Mato Grosso State, 2n = diploid number, FN = fundamental number, KF = karyotype formula, term = terminal sites.

Species	River/Basin/State/GPS	2n	FN	KF	rDNA 5S sites	rDNA 18S sites	<i>Rex1</i>
<i>Leporinus friderici</i>	Mogi-Guaçu River, Upper Paraná River Basin -SP (21°58'52" S, 47°17'36" W)	54	108	32m+22sm	pairs 10 and 11	pair 1	term
	Jangada River, Iguaçu River Basin – PR (26°13'5.22" S, 51°16'17.40" W)	54	108	32m+22sm	pairs 3 and 11	pair 1	term
<i>Leporellus vittatus</i>	Mogi-Guaçu River, Upper Paraná River Basin -SP (21°58'52" S, 47°17'36" W)	54	108	28m+26sm	pair 3	pair 5	term
	Aripuanã River, Aripuanã River Basin – MT (10°09'57.8" S, 59°26'54.9" W)	54	108	28m+26sm	pairs 6 and 8	pair 6	term
	São Francisco River, São Francisco River Basin – MG (20°16'15" S, 45°55'39" W)	54	108	28m+26sm	pair 3	pair 6	term

Figure 1. Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) after conventional Giemsa staining. Scale bar: 10  $\mu$ m.

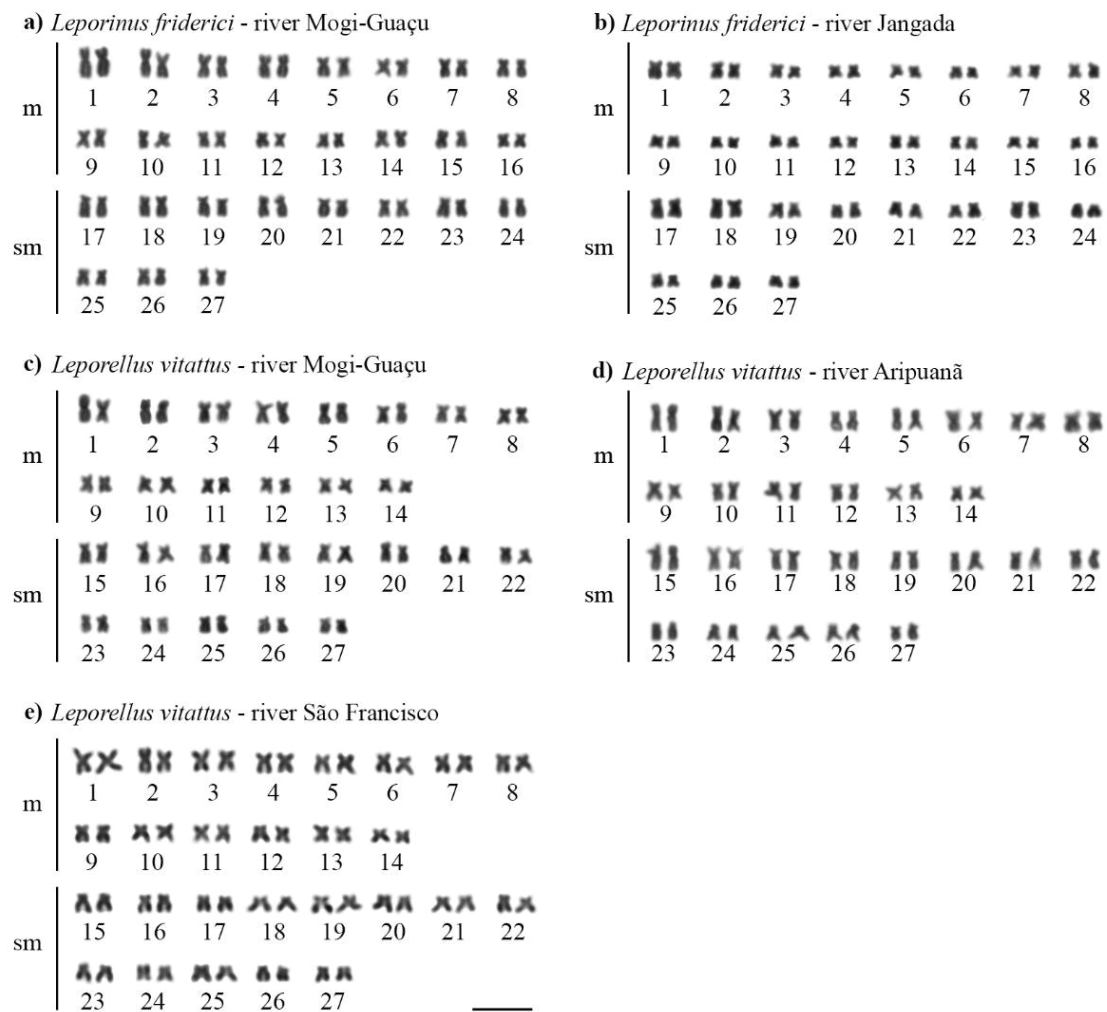


Figure 2. Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) after C-banding. Scale bar: 10  $\mu$ m.

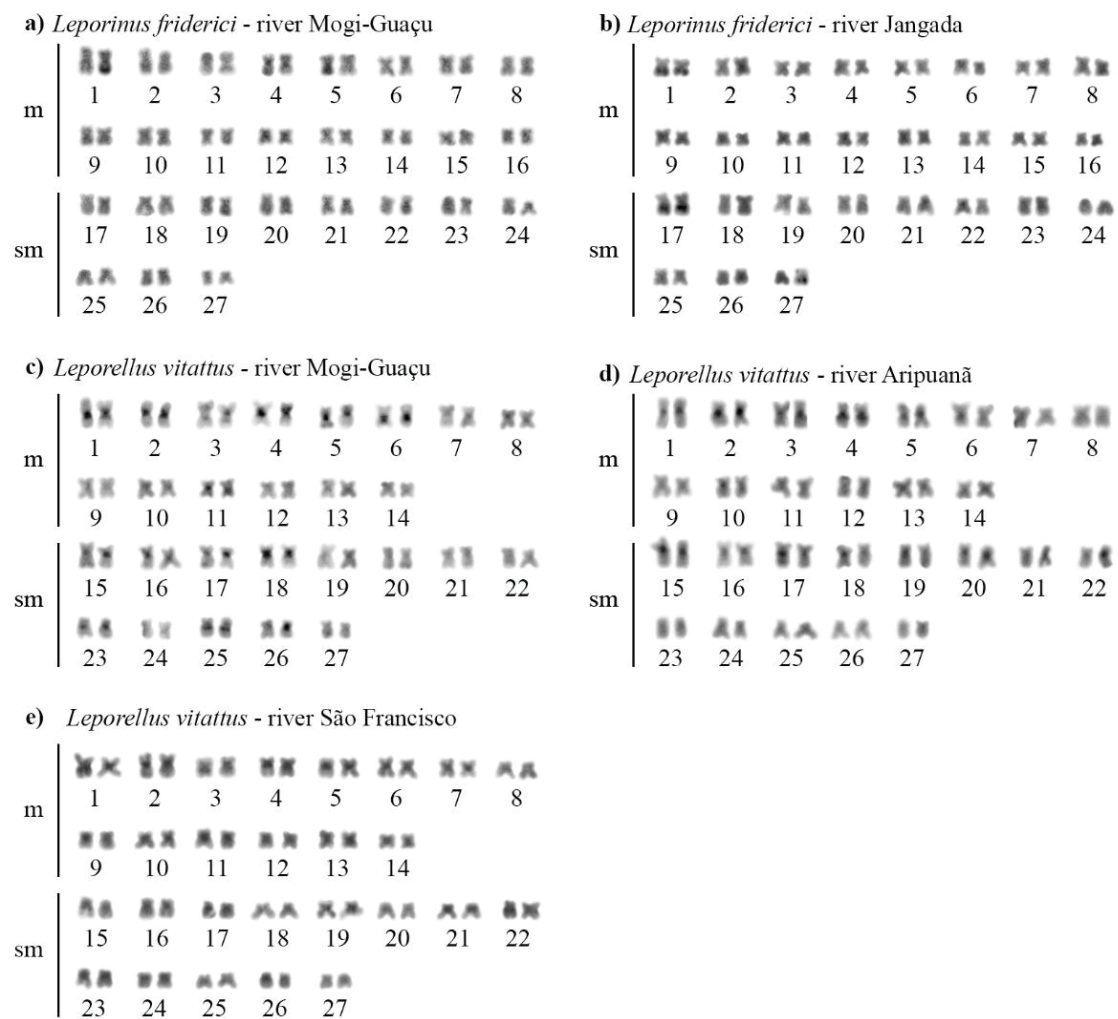


Figure 3. Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA and 5S rDNA probes. Scale bar: 10  $\mu$ m.

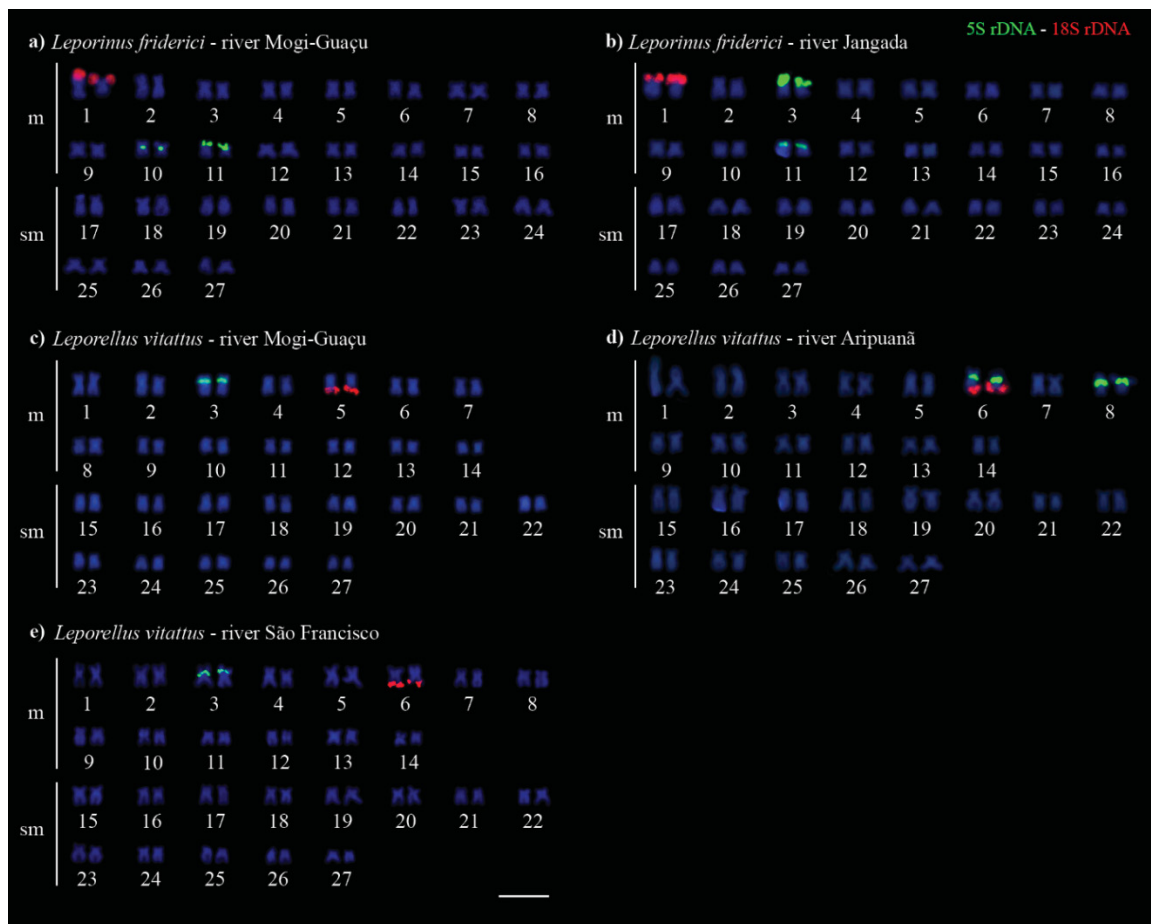




Figure 4. Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with *Rex1* probe. Scale bar: 10  $\mu$ m.





Figure 5. Karyotypes of *Leporinus friderici* (a, b) and *Leporellus vittatus* (c, d, e) submitted to fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGGG)<sub>n</sub> probe. Scale bar: 10  $\mu$ m.



## 5.2 CAPÍTULO II

Este artigo será submetido para a revista Zebrafish.

### **INFERÊNCIAS SOBRE DIVERSIFICAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Megaleporinus* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) COM BASE NA DISTRIBUIÇÃO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS**

#### **RESUMO**

O gênero *Megaleporinus* (Anostomidae) foi proposto recentemente por apresentar um conjunto de espécies em agrupamento monofilético e, onde é o único grupo de espécies desta família a apresentar sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Os representantes de Anostomidae apresentam 2n conservado de 54 cromossomos meta e submetacêntricos. Apesar desta aparente conservação, poucos são os estudos comparativos que buscam evidenciar diferenças cariotípicas menores. As famílias multigênicas de DNA ribossômico (rDNA) e pequenos RNAs nucleares (snRNAs) apresentam alta dinâmica de reposicionamento cromossômico em inúmeros organismos. Neste estudo foram avaliadas de forma comparativa duas populações de *Megaleporinus obtusidens* e uma de *Megaleporinus reinhardti* quanto a distribuição dos sítios rDNA e snRNA nos cariótipos. O objetivo foi de avaliar os mecanismos de diversificação cariotípica, com enfoque especial naqueles que diferenciaram os cromossomos sexuais ZW nesta linhagem de Anostomidae. As populações/espécies de *Megaleporinus* avaliadas apresentaram 2n=54 organizados em 28m+26sm em machos e, 28m+25sm+1st em fêmeas. As diferenças nas fórmulas cariotípicas são decorrentes de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde o Z é um submetacêntrico médio e, o W é um subtelocêntrico maior em tamanho. Uma pequena diferença no tamanho do cromossomo W entre ambas as populações de *M. obtusidens* foi detectada. Sítios cromossômicos diferentes para a localização autossômica dos rDNAs 5S e 45S foram detectados nos cariótipos de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Já para os snRNAs U1 e U2, além de inúmeros sítios dispersos nos autossomos, cópias destas sequências também foram visualizadas nos cromossomos sexuais Z e W de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*, com diferenças intra e interespecíficas de sua localização cromossômica. O conjunto de dados obtidos foi discutido na divergência cromossômica em *Megaleporinus*, principalmente quanto as diferenças cariotípicas microestruturais proporcionadas pelo reposicionamento dos rDNAs ou acúmulos diferenciais dos snRNA. Estes dados auxiliam na compreensão da sinapormorfia dos cromossomos sexuais em *Megaleporinus* e as diferenças detectadas permitem inferir sobre mecanismos de geração de incompatibilidade entre as linhagens deste grupo especioso de peixes neotropicais.

**Palavras chave:** Citogenética. Cromossomos sexuais. Peixes Neotropicais. rDNA, snRNA.

## 1 INTRODUÇÃO

Anostomidae é uma das famílias mais especiosas dos Characiformes e atualmente agrupa 158 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2019). São subdivididas em 15 gêneros e seus representantes estão distribuídos em diferentes bacias hidrográficas sul-americanas (GARAVELLO; BRITSKI, 2003; SIDLAUSKAS; VARI, 2008; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). Contudo, apesar da ampla variação morfológica de seus representantes, os estudos citogenéticos demonstraram um número diploide ( $2n$ ) conservado de 54 cromossomos, predominantemente de morfologia metacêntrica (m) e submetacêntrica (sm) (GALETTI JR; FORESTI, 1986; GALETTI JR; CESAR; VENERE, 1991; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004).

Apesar do conservadorismo do  $2n$  e morfologia cromossômica deste grupo, existem estudos demonstrando uma diversificação cariotípica quanto a distribuição e localização de DNAs repetitivos (PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; POLTRONIERI et al., 2014; DULZ et al., 2019; UTSUNOMIA et al., 2019). Algumas espécies Anostomidae apresentam cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZW, e a identificação e localização *in situ* dos DNAs repetitivos em seus representantes auxiliam no entendimento dos mecanismos envolvidos na origem e diferenciação dos cromossomos sexuais no grupo (GALETTI JR; CESAR; VENERE, 1991; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; UTSUNOMIA et al., 2019).

Recentemente o gênero *Megaleporinus* foi descrito com base em dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, resultando na realocação de dez espécies, anteriormente designadas como *Leporinus* e *Hypomasticus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). Do ponto de vista citogenético, *Megaleporinus* abrange todas as espécies da família que possuem cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, enquanto os representantes dos demais gêneros não apresentam heteromorfismo de cromossomos (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

As espécies *Megaleporinus obtusidens*, *M. reinhardti*, *M. macrocephalus*, *M. trifasciatus*, *M. conirostri* e *M. elongatus* apresentam dados citogenéticos que confirmam o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; UTSUNOMIA et al., 2019). O cromossomo W nestas espécies é sempre do tipo

subtelocêntrico, com braço longo (q) inteiramente heterocromático, enquanto o cromossomo Z é um submetacêntrico menor e possui apenas o terço distal do braço q heterocromático (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007). Em algumas espécies de *Megaleporinus* foi demonstrado que a fração heterocromática do cromossomo W está relacionada com o acúmulo de sequências repetitivas, as quais possivelmente são as responsáveis pelo seu aumento do tamanho e sua diferenciação morfológica (NAKAYAMA et al., 1994; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; UTSUNOMIA et al., 2019). Em *M. macrocephalus* Utsonomia et al. (2019) identificaram 22 tipos de DNAs satélites que compõem a região repetitiva do cromossomo W.

As sequências repetitivas constituem a maior parte dos genomas de eucariotos e estão organizados em unidades de repetições *in tandem* ou com repetições dispersas (TIMBERLAKE, 1978; CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; JURKA et al., 2005; WICKER et al., 2007). Na classe dos DNAs repetitivos *in tandem*, as famílias multigênicas apresentam atividade gênica essencial para a manutenção do genoma (NEI; ROONEY, 2005). Embora conservadas evolutivamente, as cópias parálogas de um mesmo gene das famílias multigênicas apresentam diversidade no número de unidades e na organização genômica intra e interespecífica e, por este motivo, são utilizadas como marcadores cromossômicos (HATANAKA; GALETTI JR, 2004; WALSH; STEPHAN, 2008; BARROS et al., 2017; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; GLUGOSKI et al., 2018; PUCCI et al., 2018).

Os genes do rDNA estão subdivididos em duas famílias multigênicas: a rDNA 45S transcreve para os rRNAs 18S, 5.8S e 28S enquanto a rDNA 5S transcreve o rRNA de 5S (PENDÁS et al., 1994; GALETTI JR; MARTINS, 2004; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). As estruturas transcritas destes genes apresentam alto conservadorismo, no entanto, os espaçadores intragênicos e intergênicos são variáveis (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013; BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018). As sequências rDNA são amplamente estudadas e têm fornecido informações que auxiliam no entendimento de processos evolutivos cromossômicos em muitos grupos de peixes (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013; SYMONOVÁ et al., 2013). Entre os anostomídeos, a maioria das espécies possuem um único sítio de rDNA 18S e, um ou dois sítios de rDNA 5S (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000, 2001b, BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019).

Os genes dos snRNAs apresentam cinco tipos de RNA (U1, U2, U4, U5, U6), os quais fazem parte do complexo de pequenas ribonucleoproteínas nucleares que estão associadas ao processo de *splicing* de precursores do RNAm (MANCHADO et al., 2006). A localização *in situ* dos genes de snRNAs U1 e U2 em inúmeras espécies mostraram que o número de sítios e a organização cromossômica dessa família multigênica podem ser altamente variável entre as espécies de peixes (UTSUNOMIA et al., 2014; BARROS et al., 2018; PUCCI et al., 2018). Os snRNAs podem estar acumulados em um ou mais pares cromossômicos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; BARROS et al., 2018; PUCCI et al., 2018) ou ainda estar presente em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014; CIOFFI et al., 2017).

É notável que os DNAs repetitivos são indispensáveis para o entendimento do processo de diversificação cariotípica interespecífica em peixes (VICARI et al., 2010). Em *Megaleporinus*, além da diversificação cariotípica, os DNAs repetitivos têm enfoque na diferenciação dos cromossomos sexuais de suas espécies. Este estudo teve como objetivo avaliar a diferenciação cariotípica intra/interespecífica em duas espécies de *Megaleporinus* com enfoque na divergência dos sítios cromossômicos das famílias multigênicas de rDNA e snRNA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL E PONTOS DE COLETA

Os exemplares de *Megaleporinus obtusidens* foram capturados no rio Iguaçu, bacia do rio Iguaçu, União da Vitória - Paraná (26°13'5.22"S, 51°16'17.40"O) e no rio Piumhi, bacia do rio São Francisco, Piumhi - Minas Gerais (20°16'15"S, 45°55'39"O). *Megaleporinus reinhardti* foi coletado no rio Gongogi, Dario Meira - Bahia (14°28'13.1"S, 39°57'33.1"O).

A coleta dos espécimes foi autorizada pela licença permanente para coleta de material zoológico (MMA/IBAMA/SISBIO:15117-1). Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa (Protocolo: 011/2017). Os espécimes de *Megaleporinus obtusidens* dos rios Iguaçu e Piumhi foram identificados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da

Universidade Estadual de Maringá. Já *Megaleporinus reinhardti* foi identificado por especialistas na Universidade Estadual Paulista, Campus Júlio Mesquita Filho.

## 2.1 ANÁLISE CROMOSSÔMICA CONVENCIONAL

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978), com modificações de BLANCO et al. (2012). Posteriormente, as preparações cromossômicas em lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato pH = 6,8. A detecção de heterocromatina foi de acordo com Sumner (1972) com modificações (LUI et al., 2009).

## 2.4 EXTRAÇÃO DE DNA E OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS

O DNA genômico foi extraído a partir de tecidos do fígado de espécies de *Megaleporinus obtusidens* utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com Doyle e Doyle (1990). A amplificação das sequências dos rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1 e snRNA U2 ocorreram por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação geral para cada sequência consistiu de: 100ng de DNA molde, 1x tampão da reação (200mM Tris, pH 8.4, 500mM KCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 1U Taq DNA-polimerase (5U/μl). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. Os primers utilizados nas amplificações por PCR estão descritos na tabela 1.

## 2.5 PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Após as reações de amplificação, o produto das PCRs do rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1, snRNA U2 foram purificados usando GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich) e submetidas ao sequenciamento nucleotídico em equipamento ABI-PRISM Genetic Analyzer (Carlsbad, CA). Os produtos dos sequenciamentos nucleotídicos foram editados e analisados usando o software GENEIOUS 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). As identidades das sequências foram confirmadas usando o BLASTn (NCBI) e CENSOR para sequências repetitivas (KOHANY et al., 2006). Finalmente, as sequências foram depositadas no GenBank (MH697559, MH701851).

## 2.6 MARCAÇÃO DE SONDAS

As sequências de rDNA 18S e snRNA U1 foram marcadas usando o composto digoxigenina 11-dUTP com o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante. Já as sequências do rDNA 5S e snRNA U2 foram marcadas por PCR, em reação similar a descrita acima, porém com acréscimo de 0,06 mM de biotina 16-dUTP.

## 2.7 HIBRIDAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o procedimento descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986). O protocolo foi realizado sob alta condição de estringência (2,5 ng/ $\mu$ L sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 42°C por 16 h). Para a detecção de fluorescência foram utilizados 4  $\mu$ g/mL de Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e 10  $\mu$ g/mL de anti-digoxigenin rhodamine (Roche Applied Science), os quais foram incubados a 37 °C por 1 hora no tampão de detecção [4x SSS, 0.2% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) de leite em pó desnatado]. Os cromossomos foram contracolorados com 0,2  $\mu$ g/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

## 2.8 ANÁLISES CARIOTÍPICAS

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Lab 1 acoplado ao software Zen Lite em Câmera Zeiss AxioCam ICM1, resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Os cariótipos foram organizados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6 e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE rDNA 5S E rDNA 18S parcial



A sequência do rDNA 5S revelou o tamanho de 205 pb e 91 % de similaridade com rDNA 5S de *Megaleporinus obtusidens* (GenBank: AF284747.1). Esta sequência contém 123 pb de região transcrita e 82 pb de espaçador não transcrito (NTS) (FIGURA 1). A análise da sequência evidenciou promotor interno composto por Box A (50~62 pb), elemento intermediário (IE) e Box C (81~98 pb) (FIGURA 1). Foi detectado também o finalizador poli-T (no final da região transcrita), região TATA-like (-31~-28 pb), box GC (-14~-10 pb) e C-1 (FIGURA 1). A sequência parcial de rDNA 18S revelou um tamanho de 1078 pb e 98% de similaridade com o rDNA 18S de *Clarias* sp. (GenBank: KF650737.1). As sequência do snRNA U1 e snRNA U2 ainda estão em análise.

### 3.2 NÚMERO DIPLOIDE, FÓRMULA CARIOTÍPICA, NÚMERO FUNDAMENTAL E DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA

Os exemplares de *M. obtusidens* (rios Iguaçu e Piumhi) e *M. reinhardti* exibiram  $2n=54$  cromossomos, com fórmula cariotípica (FC) igual a  $28m+26sm$  em machos e,  $28m+25sm+1st$  em fêmeas, número fundamental (NF) = 108. A diferença nas fórmulas cariotípicas entre machos e fêmeas se deve a um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, onde Z é um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio e o W é subtelocêntrico grande, o maior do complemento (FIGURA 2a, c, e). O cromossomo W de *M. obtusidens* do rio Iguaçu foi ligeiramente menor quando comparado ao *M. obtusidens* do rio Piumhi (FIGURA 2).

O bandamento C revelou tênues blocos de heterocromatina na região pericentromérica de alguns cromossomos autossômicos para ambas populações de *M. obtusidens* (FIGURA 2b, d) e para *M. reinhardti* (FIGURA 2f). Adicionalmente, em *M. reinhardti* foi possível verificar marcações terminais no braço curto (p) de um homólogo do par 17 (FIGURA 2f). O cromossomo sexual W apresentou um grande bloco heterocromático que se estendeu por quase toda a extensão do braço longo (q) nos *Megaleporinus* estudados (FIGURA 2b, d, f). Já o cromossomo Z apresentou um bloco heterocromático na porção metade distal do braço q nas populações/espécies analisadas (FIGURA 2b, d, f).

### 3.3 LOCALIZAÇÃO *in situ* DOS rDNA 5S e rDNA 18S



A dupla-FISH usando sondas de rDNA revelou um único sítio rDNA 5S no braço p (terminal) do par m 5 e, um único sítio do rDNA 18S no braço q (terminal) do par sm 15 para *M. obtusidens* do rio Iguaçu (FIGURA 3a). Já os cariótipos dos indivíduos de *M. obtusidens* do rio Piumhi apresentaram o rDNA 5S no braço p (terminal) do par m 8, enquanto o rDNA 45S foi localizado no braço p (terminal) do par m 5 (FIGURA 3b). *Megaleporinus reinhardti* apresentou o rDNA 5S no braço p (terminal) do par m 8 e rDNA 45S no braço p (terminal) do par m 2 (FIGURA 3c).

### 3.4 LOCALIZAÇÃO *in situ* DO snRNA U1

O mapeamento *in situ* da sequência snRNA U1 revelou marcações nas regiões terminais da maioria dos autossomos nas populações/espécies estudadas (FIGURA 4). Em adição, sinais snRNA U1 foram localizados em posição pericentromérica nos pares 9 e 17 de *M. obtusidens* do rio Iguaçu (FIGURA 4a), nos pares 3, 6 e 25 de *M. obtusidens* do rio Piumhi (FIGURA 4c) e, em um dos homólogos dos pares 2, 18 e 22 para *M. reinhardti* (FIGURA 4e). Sinais snRNA U1 foram localizados também dispersos ao longo do cromossomo W e nas regiões terminais do cromossomo Z das populações/espécies analisadas (FIGURA 4a, c, e). Além destes, *M. obtusidens* do rio Iguaçu evidenciou marcações de snRNA U1 em posição pericentromérica do cromossomo Z (FIGURA 4a).

### 3.5 LOCALIZAÇÃO *in situ* DO snRNA U2

A localização *in situ* do snRNA U2 evidenciou clusters no par submetacêntrico 17, braço p (proximal) em ambas populações de *M. obtusidens* (FIGURA 4b, d). Em *M. reinhardti* o snRNA U2 foi observado no braço p (proximal) do par 20 (FIGURA 4f). Em adição, sinais dispersos do snRNA U2 foram localizados em outros autossomos das populações/espécies de *Megaleporinus* estudadas (FIGURA 4b, d, f). Nos cromossomos sexuais Z e W de *M. obtusidens* (ambas as populações) e *M. reinhardti* foram visualizados sinais fracos e dispersos da sequência snRNA U2 (FIGURA 4b, d, f).

### 3.6 LOCALIZAÇÃO COMPARADA DAS FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS NOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

Os cromossomos sexuais Z das populações/espécies analisadas apresentaram morfologia e tamanho similar. Já para o cromossomo W, *M. obtusidens* do rio Iguaçu apresentou tamanho um pouco menor quando comparado aos outros (FIGURA 5). A distribuição da heterocromatina na metade distal do braço q do cromossomo Z, além de quase toda a extensão do W também foi comum entre as populações/espécies (FIGURA 5). Os rDNA não foram localizados nos cromossomos sexuais e as principais diferenças foram para as regiões de acúmulo dos snRNAs U1 e U2 (FIGURA 5). *Megaleporinus obtusidens* do rio Piumhi e *M. reinhardti* tiveram snRNA U1 em ambos os terminais cromossômicos do Z, enquanto em *M. obtusidens* do rio Iguaçu um sítio de acúmulo intersticial do braço q de snRNA U1 foi verificado (FIGURA 5). Os cromossomos W das populações/espécies analisadas compartilharam localização snRNA U1 em ambos os terminais cromossômicos, além de um sítio pericentromérico (FIGURA 5). Já o acúmulo mais forte de snRNA U1 na região subterminal do cromossomo W foi verificado apenas para as populações de *M. obtusidens* (FIGURA 5). O snRNA U2 teve acúmulo na região pericentromérica do cromossomo Z de ambas as populações de *M. obtusidens* (FIGURA 5). Para os cromossomos W, poucos sinais dispersos de snRNA U2 foram detectados em *M. obtusidens* do rio Iguaçu, sinais mais fortes na região pericentromérica e dispersos ao longo da extensão do W foram detectados em *M. obtusidens* do rio Piumhi e, sinais dispersos em toda a extensão do W foram verificados em *M. reinhardti* (FIGURA 5).

#### 4 DISCUSSÃO

Todos os espécimes analisados de ambas as populações de *M. obtusidens* e de *M. reinhardti* apresentaram a conservação do 2n e da estrutura cariotípica propostos para Anostomidae (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017). Contudo, cromossomos sexuais heteromórficos do tipo Z e W foram observados para ambas as populações de *M. obtusidens* e para *M. reinhardti*, os quais tiveram pequenas diferenças na composição da cromatina quanto a distribuição de famílias multigênicas, principalmente para a região repetitiva restrita ao cromossomo W. Diferenças interespecíficas para a composição de DNAs repetitivos na região restrita ao cromossomo W foram detectados também em outros grupos de peixes Neotropicais (SCHEMBERGER et al., 2014, 2016; ZIEMNICZAK et al., 2014; PUCCI et al., 2016). Além das diferenças para os cromossomos sexuais, sítios de localização dos rDNAs 5S

e 18S espécies/específicos foram detectados para ambas as populações de *M. obtusidens* e para *M. reinhardti*. Em um estudo com espécies dos gêneros *Leporinus* e *Leporellus* de Anostomidae foi demonstrado variação da localização de sítios de rDNA entre populações e entre espécies (DULZ et al., 2019). O estudo de Dulz et al. (2019) evidenciou a variação cariotípica microestrutural na diversificação cromossômica de Anostomidae, e os dados desta análise demonstraram que estas variações menores no cariótipo também ocorreram relacionadas a transposição de sítios ribossômicos em *Megaleporinus*.

A ocorrência de dois sítios de rDNA 5S, sendo um menor e de localização intersticial e o outro maior e terminal é situação demonstrada em alguns Anostomidae (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000, 2001a). Estes autores propuseram que estas cópias parálogas do gene rRNA 5S evoluíram em regiões separadas do genoma de anostomídeos (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000, 2001a). Espécies com um único sítio cromossômico do rDNA 5S também já foram verificadas no grupo (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019) e a análise da estrutura molecular do gene rRNA 5S de *M. obtusidens* aqui obtida é compatível com uma organização funcional. Por sua vez, a ocorrência de um único sítio cromossômico para o rDNA 45S é uma situação comum à maioria das espécies de Anostomidae (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019). Ainda, alguns poucos anostomídeos apresentam a ocorrência de sintenia dos rDNAs 5S e 18S (BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019). Os dados da literatura, assim como aqueles obtidos neste estudo evidenciam uma dinâmica de modificação cromossômica em relação as famílias multigênicas de rDNA 5S e rDNA 45S nesta família de peixes neotropicais.

A análise de citogenética comparativa entre as populações de *M. obtusidens* demonstrou localizações cromossômicas diferenciadas para os sítios rDNAs 5S e 45S. Essas diferenças são resultado de prováveis transposições, translocações e/ou inversões cromossômicas que levariam a diferenças cariotípicas microestruturais em populações isoladas, conforme proposto em Dulz et al. (2019) em *Leporinus* e *Leporellus*. O conjunto dos resultados citogenéticos encontrados neste estudo corroboram as análises de genética de populações, onde foi verificado que determinados taxa de Anostomidae (ex. *M. obtusidens*, *M. piavussu*, *M. macrocephalus*, *M. trifasciatus*, *M. muyscorum*, *M. conirostris*) organizam verdadeiros complexos de espécies para populações localizadas

em diferentes sistemas hidrográficos sul-americanos (RAMIREZ et al., 2017; SILVA-SANTOS et al., 2018).

Na mesma via, diferenças interespecíficas para a localização dos rDNAs 5S e 45S foram demonstradas em *Leporinus*, *Leporellus* e, neste estudo entre *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Symonová et al. (2013) inferiram que localizações cromossômicas diferentes para os sítios rDNA poderiam afetar as taxas de recombinação em genomas de espécies que divergiram recentemente. Entre os peixes neotropicais, alguns grupos demonstram esta situação de remodelagem cromossômica envolvendo a localização dos sítios das famílias multigênicas de rDNA entre populações ou mesmo entre espécies incipientes (PUCCI et al., 2014; BARBOSA et al., 2017). Os dados aqui apresentados em *M. obtusidens* e *M. reinhardti*, assim como os estudos citogenéticos comparativos empregando localização *in situ* dos rDNAs demonstraram alta dinâmica de reposicionamento dos rDNA em sítios cromossômicos das espécies de anostomídeos (MARTINS; GALETTI JR, 1999, 2000, 2001a; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017; DULZ et al., 2019).

Os estudos de caracterização de sequências e localização *in situ* das famílias multigênicas dos snRNAs, contrário ao que existe para os rDNAs, apresentam-se escassos e restritos à poucos grupos de espécies (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; UTSUNOMIA et al., 2014; SCACCHETTI et al., 2015; SILVA et al., 2015; SERRANO et al., 2017; MALIMPENSA et al., 2018; PONZIO; PISCO; PARISE-MALTEMPI, 2018; PUCCI et al., 2018). Os dados de localização cromossômica em peixes demonstraram que a maioria das espécies apresentam um único sítio snRNA U1 (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; UTSUNOMIA et al., 2014). A exceção foi verificada no gênero *Astyanax* onde foram evidenciados vários cromossomos com clusters snRNA U1 (SILVA et al., 2015). De modo similar, a localização de um ou poucos pares cromossômicos portando o snRNA U2 é a situação mais usual em inúmeros organismos (MERLO et al., 2010; UTSUNOMIA et al., 2014; GARCÍA-SOUTO et al., 2015; SCACCHETTI et al., 2015; SILVA et al., 2015; PISCOR; CENTOFANTE; PARISE-MALTEMPI, 2016; CIOFFI et al., 2017; SERRANO et al., 2017; MALIMPENSA et al., 2018; PONZIO; PISCO; PARISE-MALTEMPI, 2018; PUCCI et al., 2018). Os dados de localização *in situ* dos snRNA U1 e U2 em *M. obtusidens* e *M. reinhardti* demonstraram um grande número de cópias dispersas pelos autossomos e cromossomos sexuais ZW, principalmente para o snRNA U1. Este grande número de cópias snRNA U1 e U2 visualizadas em *M. obtusidens* e *M. reinhardti* são

compatíveis com a associação desta família gênica à elementos transponíveis, como demonstrado em outros organismos (MARZ; KIRSTEN; STADLER, 2008).

O snRNAs podem estar associados com elementos transponíveis (TEs) e, desta forma, apresentar duplicação de suas sequências mediadas pela movimentação dos TEs (MARZ; KIRSTEN; STADLER, 2008). Nessa via, Marz, Kirsten e Stadler (2008) propuseram que a maioria das cópias duplicadas do snRNA seriam de genes truncados e provavelmente inativos. Outros estudos demonstraram que alguns TEs apresentam segmentos internos com similaridade a um tipo de snRNA (KOJIMA; FUJIWARA, 2004; KOJIMA; JURKA, 2015; PUCCI et al., 2018). Nesta segunda situação, o excesso de cópias snRNAs visualizadas *M. obtusidens* e *M. reinhardti* poderia ser consequência da localização do TE similar à esta família multigênica e, não necessariamente apresentar cópias duplicadas dos snRNA U1 e U2. Especificamente para o snRNA U2, um cluster principal pode ser identificado em *M. obtusidens* (par 17) e *M. reinhardti* (par 20) e este sítio é similar ao encontrado em *M. elongatus* e *M. macrocephalus* (PONZIO; PISCO; PARISE-MALTEMPI, 2018).

Em peixes, cópias acumuladas dos snRNA U1 e de marcações dispersas de snRNA U2 foram verificadas no cromossomo W de *Triporthus* (CIOFFI et al., 2017). Em *Gymnotus pantanal* os snRNAs foram detectados no cromossomo X<sub>1</sub> e ausentes no Y (UTSUNOMIA et al., 2014). Já em ambas as populações de *M. obtusidens* e em *M. reinhardti* foram detectadas cópias de snRNA U1 e snRNA U2 nos cromossomos sexuais em diferentes quantidades e com pequenas diferenças quanto a sua localização cromossômica, principalmente para os cromossomos W. Com estes resultados é possível inferir que estes snRNAs tiveram participação na diferenciação dos cromossomos sexuais de maneira independente em cada uma destas linhagens.

A presença de sistema de cromossomos de sexuais ZZ/ZW é verificada em todas as espécies de *Megaleporinus* estudadas citogeneticamente: *M. obtusidens*, *M. macrocephalus*, *M. conirostris*, *M. reinhardti*, *M. trifasciatus* e *M. elongatus* (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; 2013; POLTRONIERI et al., 2014; BARROS; GALETTI JR; FELDBERG, 2017). Anteriormente todas estas espécies eram agrupadas no gênero *Leporinus*. No entanto, uma reorganização filogenética de Anostomidae com base em marcadores morfológicos, citogenéticos e moleculares mostrou que estas espécies formam grupo monofilético e permitiu a descrição de *Megaleporinus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017). Os dados citogenéticos de ambas as populações de *M. obtusidens* e *M. reinhardti* corroboram com a proposta de Ramirez, Birindelli e

Galetti Jr (2017) e coloca a ocorrência dos cromossomos sexuais em condição sinapomórfica em *Megaleporinus*.

A distribuição da heterocromatina nos autossomos de anostomídeos mostra blocos pericentroméricos ou terminais em poucos cromossomos (GALETTI JR; CESAR; VENERI, 1991). Por outro lado, os cromossomos sexuais em *Megaleporinus* apresentam blocos evidentes de heterocromatina no braço q, principalmente o W, o qual tem quase toda a extensão do braço q heterocromática (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; POLTRONIERE et al., 2014; PARISE-MALTEMPI et al., 2013). Essa condição é compartilhada em *M. obtusidens* e *M. reinhardti* avaliados neste estudo e reforçam a proposta de intensa participação de DNAs repetitivos na origem do par de cromossomos sexuais heteromórficos de *Megaleporinus*.

A proposta de origem dos cromossomos sexuais nos diferentes grupos indica que estes teriam se originado a partir de um par de autossomos (proto-cromossomos sexuais) que passam a divergir para formar o cromossomo heteromórfico Y ou W (MULLER, 1964; OHNO, 1967). A primeira fase desta via de origem envolve a supressão da recombinação entre os homólogos dos proto-cromossomos sexuais por meio de rearranjos cromossômicos ou por meio de acúmulo de sequências repetitivas, as quais resultam na diferenciação genética e morfológica do cromossomo sexual heteromórfico (OHNO, 1967, CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005, STEINEMANN; STEINEMANN, 2005). *Megaleporinus* apresenta os cromossomos sexuais Z e W altamente diferenciados em todas as espécies avaliadas e Utsunomia et al. (2019) demonstraram a ocorrência de 22 tipos diferentes de DNAs satélites na composição da região repetitiva específica do cromossomo W de *M. macrocephalus*, sendo dez destes compartilhados em *M. obtusidens*.

Contudo, este é o primeiro estudo que descreve os snRNAs U1 e U2 localizados nos cromossomos sexuais de *Megaleporinus*. As diferenças nas intensidades dos sinais indicam diferentes números de cópias destas famílias gênicas nos cromossomos Z e W de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Também, regiões de acúmulos nos cromossomos sexuais Z e W demonstraram ter localizações diferentes em ambas as populações de *M. obtusidens* e em *M. reinhardti*. A diferenciação dos cromossomos sexuais é intrigante na história evolutiva das espécies e, inúmeros estudos propõem que devido a rápida diferenciação de sequências entre os cromossomos Z e W (ou X e Y) poderiam culminar na especiação (MACAYA-SANZ et al., 2011; QVARNSTRÖM; BAILEY, 2009; PUCCI et al., 2014).



Nossos resultados mostraram um cenário particular em relação à distribuição das famílias multigênicas de rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1 e snRNA U2 nos cromossomos de duas populações de *M. obtusidens* e para *M. reinhardti*. Os dados obtidos indicam que embora os *Megaleporinus* apresentem o 2n e a fórmula cariotípica altamente conservados, diferenças cromossômicas para a localização e distribuição das famílias gênicas são evidentes e organizam diferenças cromossômicas intra e interespecíficas menores. A variabilidade de sinais e de localização cromossômica evidenciaram um intenso dinamismo de movimentação dos snRNA U1 e U2 nos genomas de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. A localização dos snRNA U1 e U2 em diferentes sítios e acúmulos nos cromossomos sexuais corroboram a proposta de que as diferenças observadas são decorrentes da diversificação dos grupos e, que estas diferenças poderiam atuar na evolução da incompatibilidade reprodutiva entre espécies.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença número: 10538-1 para coleta de espécimes na natureza). O estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, - código de financiamento 001) e, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## REFERÊNCIAS

As referências deste capítulo encontram-se organizadas no final da tese.

TABELA 1 – Conjunto de primers utilizadas para obtenção das sequências repetitivas rDNA 5S, rDNA 18S, snRNA U1, snRNA U2.

Identificação	Sequência dos primers (5' - 3')	Referências
rDNA 18S- Fw	CCGCTTTGGTGACTCTTGAT	Gross et al. (2010)
rDNA 18S-Rw	CCGAGGACCTCACTAAACCA	
rDNA 5S-5SA	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Martins e Galetti (1999)
rDNA 5S-5SB	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA	
snRNA U1- ColU1F	CTTACCTGGCGTRGRGGWY	Cabral-de-Mello et al. (2012)
snRNA U1-ColU1R	CAKTCCCRRTACCAAAAATT	
snRNA U2- U2F	ATCGCTTCTCGGCCTTATG	Bueno et al. (2013)
snRNA U2- U2R	TCCCGGCGGTACTGCAATA	

FONTE: O Autor (2019).



FIGURA 1- Sequência do rDNA 5S de *Megaleporinus obtusidens* evidenciando os sítios gênicos conservados.

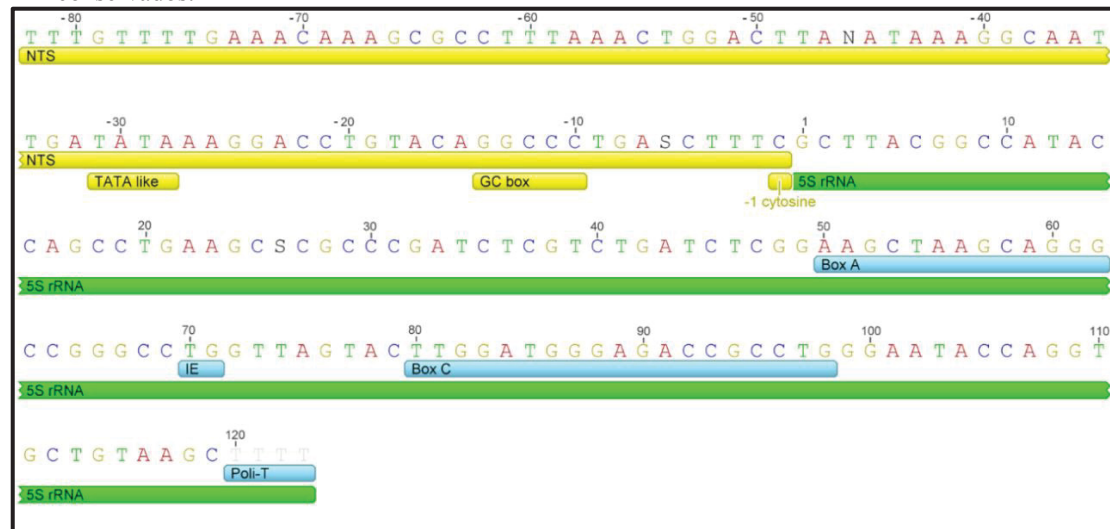


FIGURA 2 - Cariótipos de *Megaleporinus* após coloração convencional com Giemsa (a, c, e) e Banda C (b, d, e). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

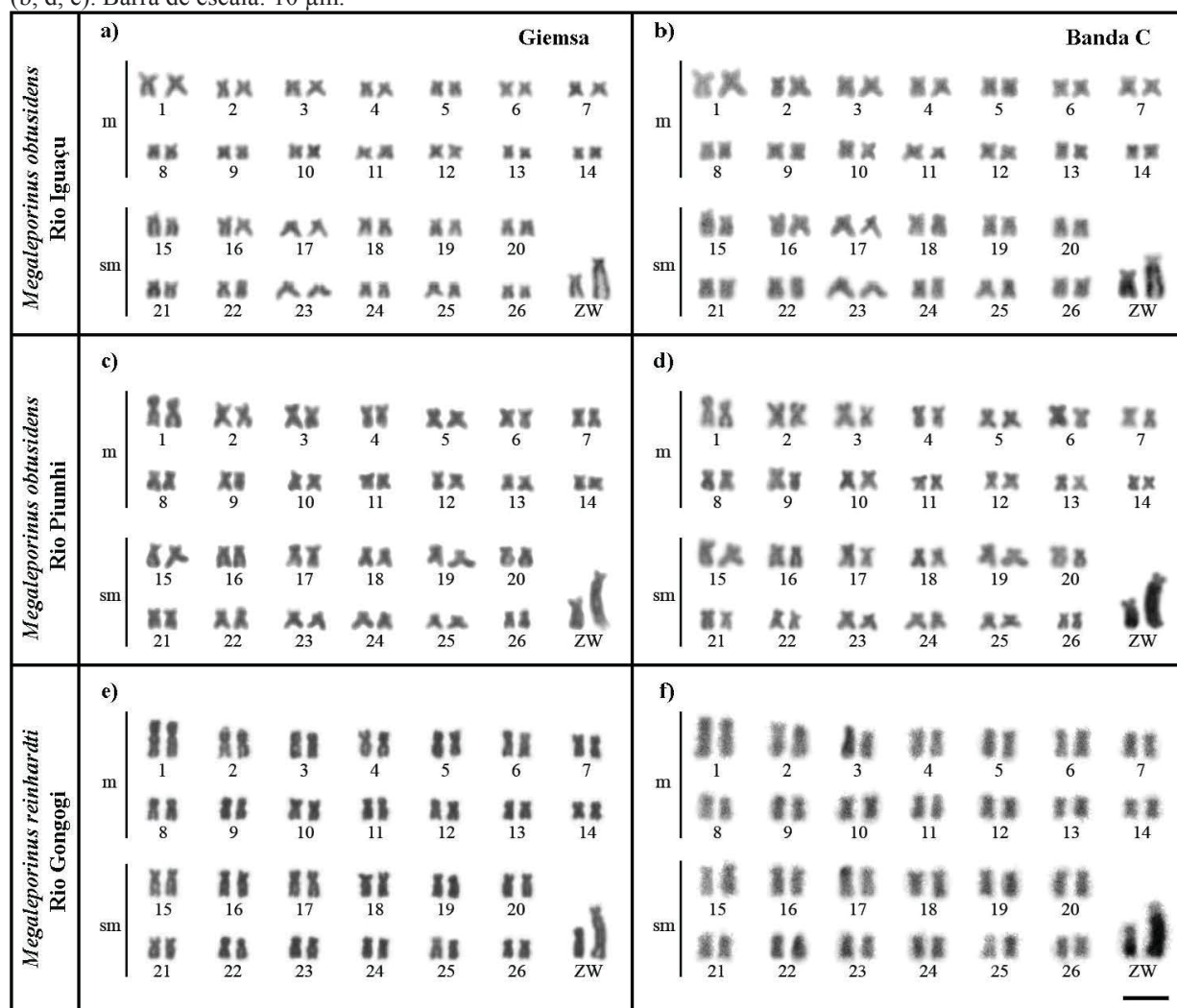


FIGURA 3 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S (verde) e rDNA 18S (vermelho). Escala da barra=10  $\mu$ m.

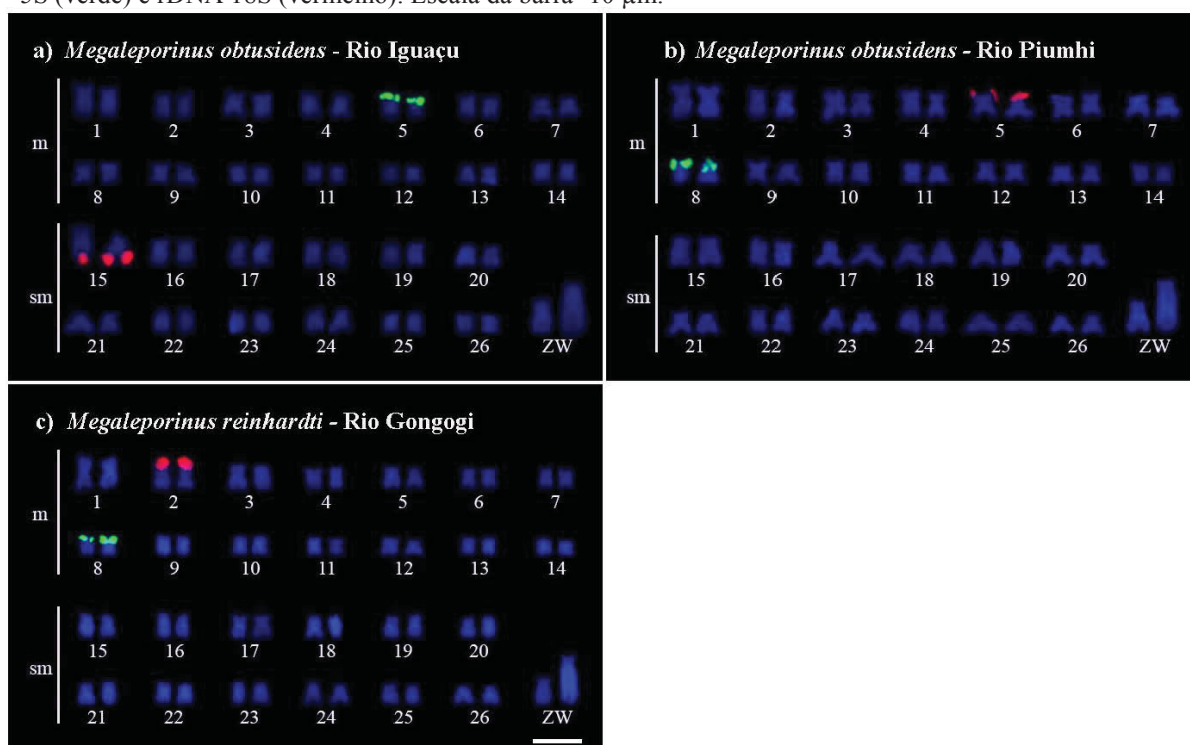


FIGURA 4 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de snDNA U1 e U2. Escala da barra=10  $\mu$ m.

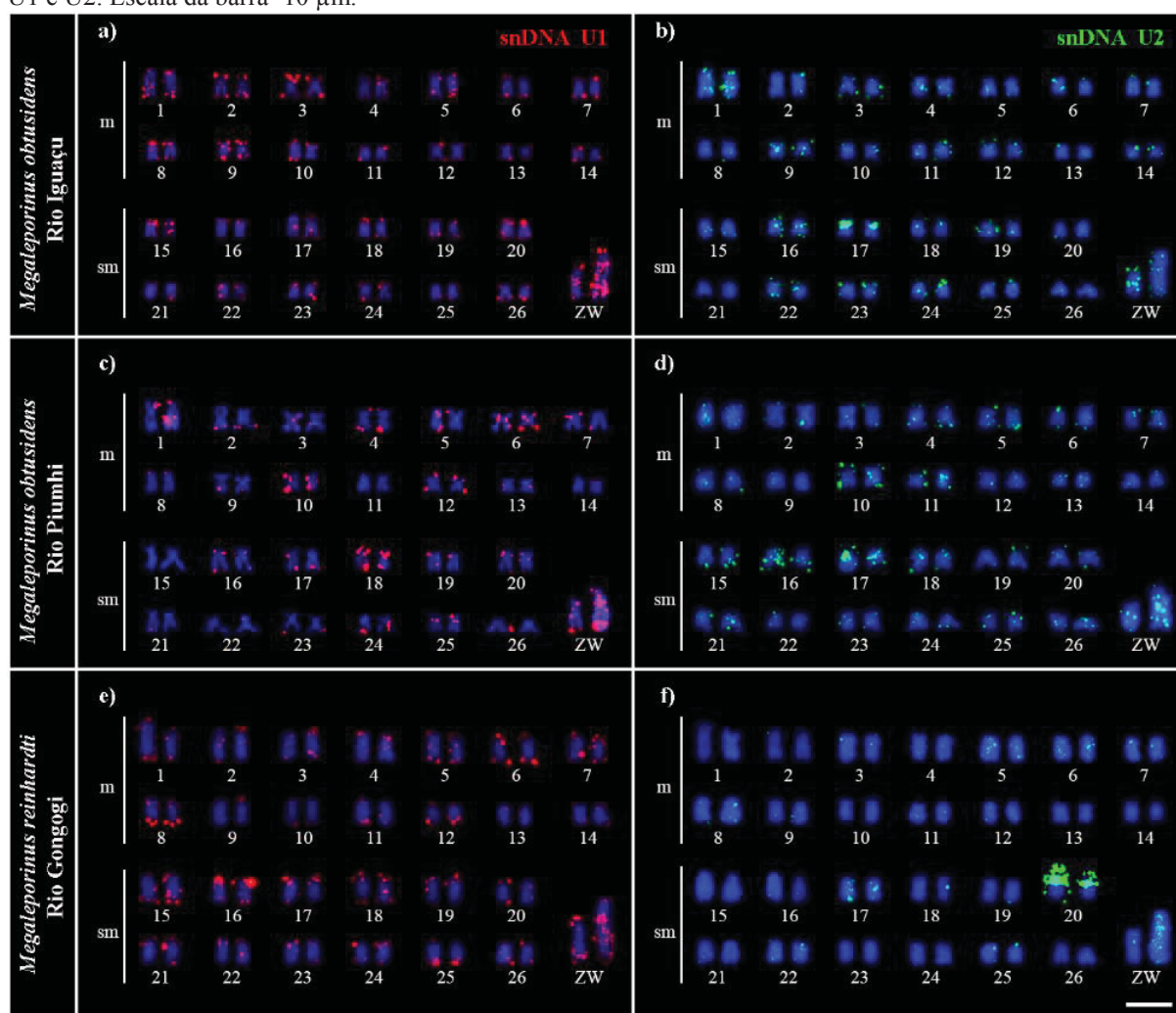
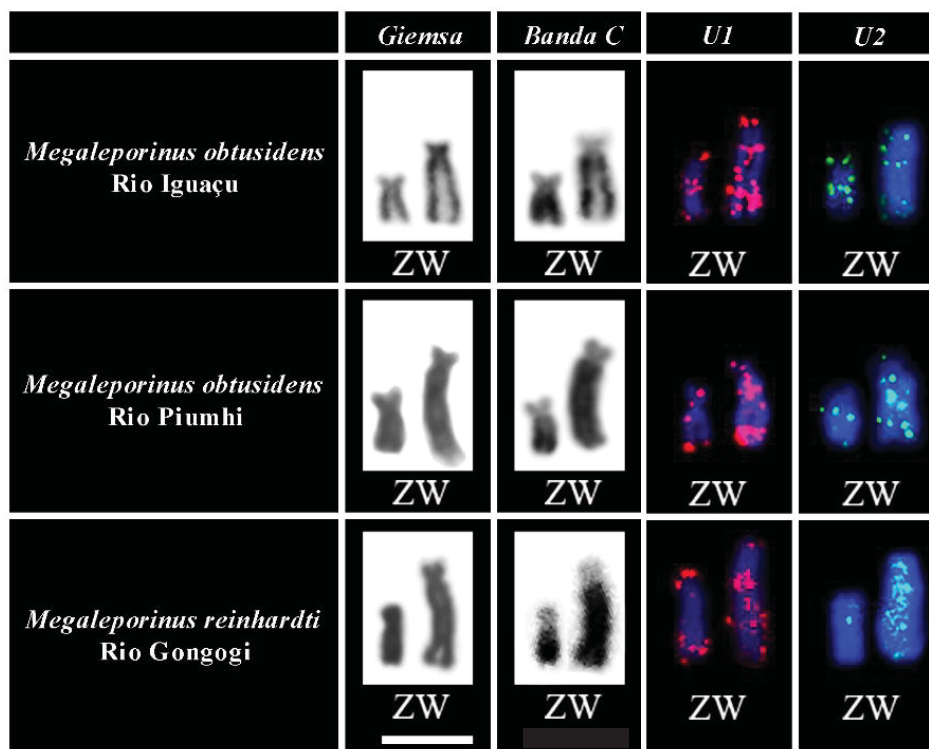


FIGURA 5 - Comparação dos cromossomos Z e W de *Megaleporinus* após a aplicação de técnicas citogenéticas convencionais (Giemsa e banda C) e de citogenética molecular (FISH) com sondas dos pequenos RNAs nucleares (snRNA U1 e U2). Escala da barra=10  $\mu$ m.



## 5.3 CAPÍTULO III

Este artigo será submetido para a Biological Journal of the Linnean Society.

**EVIDÊNCIAS DA ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS  
SEXUAIS DE *Megaleporinus obtusidens* E *Megaleporinus reinhardtii*  
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE)**

**Resumo**

Cromossomos sexuais apresentam origem comum dentro de gêneros de algumas famílias de peixes Neotropicais. No entanto, o conhecimento sobre a constituição da cromatina com os diferentes tipos de DNAs repetitivos que compõem os cromossomos X e Y ou Z e W são precariamente compreendidos. *Megaleporinus* agrupa espécies em um ramo monofilético que detém a condição sinapomórfica de cromossomos sexuais Z e W diferenciados. Neste estudo foram isolados e localizados *in situ* diferentes tipos de elementos transponíveis (TEs) e expansões de repetições *in tandem* para a compreensão da diferenciação cariotípica em duas populações de *M. obtusidens* e em *M. reinhardtii*, com enfoque na origem dos seus cromossomos sexuais Z e W e tipos de sequências repetitivas que promoveram sua diferenciação. Os dados obtidos demonstraram o conservadorismo do 2n, fórmula cromossômica e morfologia dos cromossomos sexuais em *M. obtusidens* e *M. reinhardtii*. Contudo, o mapeamento das sequências repetitivas demonstrou variação intra e interespecífica de localização de sítios, principalmente nos cromossomos Z e W. Neste estudo foi proposto a participação dos TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* na origem do proto cromossomo W de *Megaleporinus*. Atualmente estes três TEs se encontram acumulados nas populações/espécies de *M. obtusidens* e *M. reinhardtii*, principalmente o TE *Gypsy* que apresenta grande distribuição no cromossomo W. Mecanismos de diferenciação dos TEs após seu acúmulo nos cromossomos sexuais foram propostos, tais como a gênese de expansões microssatélites e/ou DNAs satélites a partir de TEs. Dessa forma, as expansões *in tandem* localizadas nos cromossomos Ws de *M. obtusidens* e *M. reinhardtii* podem ter influenciando na modificação da sua estrutura de cromatina eucromática para heterocromática. As sequências repetitivas utilizadas neste estudo demonstraram uma alta dinâmica intra e interespecífica de localização em diferentes sítios nos cromossomos sexuais, os quais podem ter cooperado na especiação do gênero.

Palavras chave: Elementos transponíveis. Evolução cariotípica. *Gypsy*. *Rex*. Repetições *in tandem*.

## 1 INTRODUÇÃO

Cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados estão presentes em várias espécies de peixes neotropicais, onde em diferentes grupos são evidenciadas tanto a heterogametia masculina (X e Y) como a heterogametia feminina (Z e W) (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002). Os sistemas de cromossomos sexuais podem ser simples (com um par de cromossomos sexuais) ou deter mais de um par cromossômico na constituição dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos de peixes (para uma revisão ver MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1980; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; OLIVEIRA et al., 2008). *Megaleporinus* é o único gênero de Anostomidae (Teleostei: Characiformes) que apresenta cromossomos sexuais ZZ/ZW diferenciados (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR., 2017).

Anteriormente descritos como *Leporinus*, o gênero *Megaleporinus* foi proposto por apresentar um grupo de espécies em um ramo monofilético e, que apresentam a condição sinapomórfica da presença dos cromossomos sexuais Z e W diferenciados (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR., 2017). O gênero agrupa dez espécies, entre as quais seis apresentam estudos citogenéticos e a ocorrência de sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, sendo elas: *M. obtusidens*, *M. conirostris*, *M. reinhardti*, *M. trifasciatus* e *M. macrocephalus* (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; PARISE-MALTEMPI et al., 2007), além de *M. elongatus*, a qual apresenta sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo  $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$  (PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013).

O cromossomo W deste grupo é um subtelocêntrico, destacadamente o maior do complemento cromossômico e, apresenta o braço longo inteiramente heterocromático (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995). Já o cromossomo Z é um submetacêntrico e possui apenas o terço distal do braço longo heterocromático (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007). A composição heterocromática do cromossomo W de *Megaleporinus* está relaciona com o acúmulo de sequências repetitivas de DNA, que ao longo do processo evolutivo contribuíram para a sua diferenciação (NAKAYAMA et al. 1994; GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; POLTRONIERI et al., 2014; SPLENDORE DE BORBA; LOURENÇO DA SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013; UTSUNOMIA et al., 2019).



Estudos em diferentes grupos de espécies sentenciaram que a primeira etapa na diferenciação de um cromossomo sexual é guiada pelo acúmulo de elementos transponíveis (TEs) (STEINEMANN; STEINEMANN, 1998; SCHEMBERGER et al., submetido para publicação). Este acúmulo de sequências repetitivas proporcionaria a formação de uma região restrita a recombinação, onde adjacentes a estas áreas, os prováveis genes da determinação sexual permaneceriam confinados no cromossomo heterogamético (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005). Após, a diferenciação do cromossomo sexual outra importante etapa seria a transformação da cromatina eucromática na região restrita ao cromossomo heteromórfico em heterocromática (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005).

Embora conhecido que os cromossomos sexuais tendem a acumular sequências repetitivas de DNA, estes são de diferentes tipos e classes (JURKA et al., 2005; WICKER et al., 2007). A diferenciação do cromossomo sexual de um grupo ou mesmo de uma espécie envolve um acúmulo independente de sequências repetitivas ao longo da diversificação da linhagem, o que torna o cromossomo sexual heteromórfico de cada espécie único, com uma miscelânea de diferentes DNAs repetitivos (SCHEMBERGER et al., submetido para publicação).

As sequências de DNAs repetitivos são classificadas em dois grandes tipos nos genomas eucarióticos, as repetições *in tandem* e as repetições dispersas (SUMNER, 2003; JURKA et al., 2005; LÓPEZ-FLORES, GARRIDO-RAMOS, 2012). As repetições *in tandem* incluem as famílias multigênicas, além das sequências denominadas satélites, minissatélites e microsatélites, classificadas conforme o número de repetições de pares de bases que possuem (JURKA; KAPITONOV; SMIT, 2003; SUMNER, 2003). As sequências dispersas são definidas pelos TEs, os quais são organizados em duas classes de acordo com os mecanismos de transposição, similaridades de sequências e relações estruturais (WICKER et al., 2007). A Classe I, ou retrotransposons que se movem por transcrição reversa, através de um intermediário de RNA e, a classe II ou DNA transposons, os quais se transpõem por meio de um intermediário de DNA (WICKER et al., 2007).

Em *Megaleporinus*, análises citogenéticas demonstraram a presença dos elementos retrotransponíveis (RTE) *Rex 1* e *Rex3*, além de algumas expansões microsatélites nos cromossomos sexuais de algumas espécies (POLTRONIERI et al., 2014; SPLENDORE DE BORBA; LOURENÇO DA SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013). Em outra análise, o DNA satélite *LeSpeI* foi isolado do genoma de *M. elongatus*



e localizado *in situ* nos cromossomos sexuais de algumas espécies do gênero (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; MARRETA; FALDONI; PARISE-MALTEMPI, 2012). Já em *M. macrocephalus* foram identificados 22 tipos de DNAs satélites que compõem a região repetitiva do cromossomo W, dos quais dez foram compartilhados no cromossomo W de *M. obtusidens* (UTSUNOMIA et al., 2019).

Apesar de todos estes estudos, a composição da cromatina dos cromossomos sexuais de *Megaleporinus* ainda não está totalmente compreendida. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar de maneira comparativa a distribuição de DNAs repetitivos nos cromossomos de duas populações de *Megaleporinus obtusidens* e em *Megaleporinus reinhardti*, com enfoque especial na compreensão das diferenças dos tipos de sequências repetitivas que participaram da diferenciação dos seus cromossomos sexuais Z e W.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PONTOS DE COLETA E OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Os exemplares de *Megaleporinus obtusidens* foram capturados no rio Iguaçu, bacia do rio Iguaçu, União da Vitória - Paraná (26°13'5.22"S, 51°16'17.40"O) e no rio Piumhi, bacia do rio São Francisco, Piumhi - Minas Gerais (20°16'15"S, 45°55'39"O). *Megaleporinus reinhardti* foi coletado no rio Gongogi, Dario Meira - Bahia (14°28'13.1"S, 39°57'33.1"O).

A coleta dos espécimes foi autorizada pela licença permanente para coleta de material zoológico (MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1). Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ponta Grossa (Protocolo: 011/2017). Os espécimes de *Megaleporinus obtusidens* dos rios Iguaçu e Piumhi foram identificados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá. Já *Megaleporinus reinhardti* foi identificado por especialistas na Universidade Estadual Paulista, *Campus* Júlio Mesquita Filho. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho, 1978), com modificações de Blanco et al. (2012).

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA E OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS

A extração do DNA genômico foi realizada a partir do fígado de exemplares de *M. obtusidens* utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com Doyle e Doyle (1990). A amplificação das sequências *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* ocorreram por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação geral para cada sequência consistiu de: 100ng de DNA molde, 1x tampão da reação (200mM Tris, pH 8.4, 500mM KCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 1U Taq DNA-polimerase (5U/μl). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. Ainda, a obtenção da sequência (GATA)<sub>n</sub> seguiu o procedimento descrito em Traldi et al. (2013) e a sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> seguiu o descrito em Ijdo et al. (1991). Os primers utilizados nas amplificações por PCR estão descritos na tabela 1.

## 2.3 SÍNTESE DAS SONDAS PARA A LOCALIZAÇÃO *in situ*

A sequência de *Rex1* foi marcada usando o composto digoxigenina 11-dUTP com o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science). Já as sequências de *Rex3* e *Gypsy* foram marcadas com biotina 11-dUTP utilizando o kit BIO-Nick Translation Mix (Roche Applied Science). As sequências (TTAGGG)<sub>n</sub> e (GATA)<sub>n</sub> foram marcadas por PCR com digoxigenina 11-UTP de acordo com o descrito em Traldi et al. (2013). As sequências dos microssatélites (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub> foram marcadas com digoxigenina em sua extremidade 5' durante sua síntese (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

## 2.4 LOCALIZAÇÃO *in situ* FLOURESCENTE

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o procedimento descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986). O protocolo foi realizado sob alta condição de estringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 42°C por 16 h). Para a detecção de fluorescência foram utilizados 4 μg/mL de Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e 10 μg/mL de anti-digoxigenin rhodamine (Roche Applied Science), os quais foram incubados a 37 °C por

1 hora no tampão de detecção [4x SSS, 0.2% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) de leite em pó desnatado]. Os cromossomos foram contracolorados com 0,2 µg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Posteriormente, as lâminas de FISH foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Lab 1 acoplado ao software Zen Lite em Câmera Zeiss AxioCam ICM1, resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Os cariótipos foram organizados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6 e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964).

### 3 RESULTADOS

Os exemplares de *M. obtusidens* (rios Iguaçu e Piumhi) e *M. reinhardti* exibiram  $2n=54$  cromossomos, com fórmula cariotípica (FC) igual a  $28m+26sm$  em machos e,  $28m+25sm+1st$  em fêmeas, número fundamental (NF) = 108 (FIGURA 2) e tiveram descrição cariotípica em Dulz et al. (capítulo 2). As diferenças nas fórmulas cariotípicas entre machos e fêmeas se deve a um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, onde Z é um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio e o W é subtelocêntrico grande, o maior do complemento.

#### 3.1 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO COM OS RTEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy*

O padrão de distribuição do RTE *Rex1* obtido por FISH mostrou sinais nas regiões terminais dos braços longos (q) e curtos (p) da maioria dos autossomos de ambas as populações de *M. obtusidens* e de *M. reinhardti* (FIGURA 1a, c, e). Em ambas as populações de *M. obtusidens* houve um grande acúmulo de *Rex1* ao longo da metade distal braço q do cromossomo W e, um pequeno acúmulo na região intersticial no braço q do cromossomo Z, apenas para a população do rio Iguaçu (FIGURAS 1a, c, 6). Em *M. reinhardti* *Rex1* foi localizado na porção terminal de ambos os braços do cromossomo W enquanto o cromossomo Z apresentou maior acúmulo *Rex1* na região terminal do braço curto (FIGURAS 1e, 6).

A localização *in situ* do RTE *Rex3* em *M. obtusidens* do rio Iguaçu evidenciou acúmulos mais evidentes nas posições terminais dos braços cromossômicos p e q dos pares 8, 9, 13 e 20, além de marcações dispersas ao longo dos braços cromossômicos

dos pares 7, 12, 14, 25 e 26 (FIGURA 1b). O cromossomo sexual Z de *M. obtusidens* do rio Iguaçu evidenciou um sítio *Rex3* na região intersticial do braço q enquanto o cromossomo W apresentou sítios dispersos ao longo de toda sua extensão (FIGURAS 1b, 6). Alguns autossomos de *M. obtusidens* do rio Piumhi apresentaram acúmulos *Rex3* em suas regiões terminais (FIGURA 1d). Nos pares 8, 9, 18, 19, 22 e 23 este RTE foi disperso ao longo de todos os cromossomos e, no cromossomo W foi visualizado um pequeno acúmulo proximal e um maior acúmulo subterminal no braço q (FIGURAS 1d e 6). Em *M. reinhardti* sítios de acúmulos *Rex3* foram visualizados nas regiões terminais de quase todos os autossomos além de um sítio proximal no braço q do par 17 (FIGURA 1f). O cromossomo Z de *M. reinhardti* apresentou acúmulos *Rex3* na região terminal do braço p e na metade distal do braço q enquanto o cromossomo W apresentou acúmulos *Rex3* na região terminal do braço p, na região pericentromérica e na metade distal do braço q (FIGURAS 1f, 6).

O RTE *Gypsy* em *M. obtusidens* do rio Iguaçu foi localizado em praticamente todas as regiões terminais dos autossomos, disperso por toda a extensão dos pares cromossômicos 8, 12, 16, 20 e 23, além de grande acúmulo na região intersticial do braço q do cromossomo Z e por praticamente toda a extensão do cromossomo W (FIGURAS 2a, 6). Em *M. obtusidens* do rio Piumhi o RTE *Gypsy* foi localizado em praticamente todas as regiões terminais dos autossomos, em pequenos acúmulos da região intersticial dos pares cromossômicos 5, 8 e 14, além de grande acúmulo na região intersticial do braço q do cromossomo Z e por praticamente toda a extensão do cromossomo W (FIGURAS 2b, 6). Já em *M. reinhardti* o RTE *Gypsy* foi localizado em praticamente todas as regiões terminais dos autossomos, na região intersticial do par 5, além de grande acúmulo na região intersticial do braço q do cromossomo Z e por praticamente toda a extensão do cromossomo W (FIGURAS 2c, 6).

### 3.2 LOCALIZAÇÃO *in situ* DAS REPETIÇÕES *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (CA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub>

A FISH com a sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> evidenciou sinais de hibridização nas regiões terminais de todos os cromossomos analisados (FIGURA 3). Sítios de sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram visualizados na região pericentromérica e subterminal no braço q do cromossomo W de *M. obtusidens* do rio

Iguaçu (FIGURAS 3a, 6) e, em região intersticial no braço q dos cromossomos Ws de *M. obtusidens* do rio Piumhi e em *M. reinhardti* (FIGURAS 3b, c, 6).

A localização *in situ* da sequência (GATA)<sub>n</sub> em *M. obtusidens* do rio Iguaçu demonstrou sítios terminais na maioria dos autossomos, na posição subterminal do braço q dos cromossomos 1, 5 e 12 e, na região intersticial dos pares 5, 18, 20 e 24 (FIGURA 4a). Os cromossomos sexuais desta espécie tiveram sítio (GATA)<sub>n</sub> na região terminal dos braços p além de um sítio subterminal no cromossomo Z (FIGURAS 4a, 6). Em *M. obtusidens* do rio Piumhi a sequência (GATA)<sub>n</sub> foi localizada em sítios terminais na maioria dos autossomos, na posição subterminal do braço q dos cromossomos 1 e 5 e, na região proximal do braço q do par 18 (FIGURA 4c). Nos cromossomos sexuais destes exemplares de *M. obtusidens* a sequência (GATA)<sub>n</sub> foi localizada na região terminal dos braços curtos dos cromossomos Z e W, na região subterminal do braço q do cromossomo Z e na região intersticial do braço q do cromossomo W (FIGURAS 4c, 6). Em *M. reinhardti*, (GATA)<sub>n</sub> foi localizada em sítios terminais na maioria dos autossomos, na posição subterminal do braço q dos cromossomos 18 e 19 e, em acúmulos dispersos na região intersticial dos pares 5, 7, 10, 22 e 26 (FIGURA 4e). Os seus cromossomos sexuais apresentaram (GATA)<sub>n</sub> localizada na região terminal dos braços curtos dos cromossomos Z e W, e na região intersticial do braço q do cromossomo W (FIGURAS 4e, 6).

A sequência (GA)<sub>15</sub> em *M. obtusidens* do rio Iguaçu foi localizada na região subterminal do braço q do cromossomo 1, além de sítios terminais na maioria dos autossomos e nos cromossomos Z e W (FIGURAS 4b, 6). Já em *M. obtusidens* do rio Piumhi a sequência (GA)<sub>15</sub> foi localizada na região proximal do braço q nos pares 1 e 6, em ambas as regiões terminais da maioria dos autossomos, além da região terminal do braço p nos cromossomos Z e W (FIGURAS 4d, 6). Em *M. reinhardti*, (GA)<sub>15</sub> foi localizada em sítios proximais do braço q nos cromossomos 4, 15 e 22, em ambas as regiões terminais da maioria dos autossomos e do cromossomo Z, além da região terminal do braço p no cromossomo W (FIGURAS 4f, 6).

A sequência (CA)<sub>15</sub> foi localizada em sítios terminais de todos os autossomos em *M. obtusidens* dos rios Iguaçu e Piumhi e em *M. reinhardti* (FIGURA 5a, c, e). Já para os cromossomos sexuais, em *M. obtusidens* do rio Iguaçu o cromossomo Z apresentou pequenos sítios (CA)<sub>15</sub> terminais em ambos os braços, enquanto o W apresentou um grande acúmulo em todo o braço p e na metade proximal do braço q, além de um pequeno sítio terminal no braço q (FIGURAS 5a, 6). Em *M. obtusidens* do

rio Piumhi, a sequência (CA)<sub>15</sub> foi localizada no cromossomo Z em seu braço p, além de um acúmulo intersticial outro terminal no braço q, enquanto o cromossomo W apresentou um acúmulo na região pericentromérica e um grande acúmulo na metade distal do braço q (FIGURAS 5c, 6). Já em *M. reinhardti* o cromossomo Z apresentou um grande acúmulo (CA)<sub>15</sub> na região terminal do braço p e em um sítio pequeno na região terminal do braço q, enquanto no W esta sequência foi localizada acumulada no braço p, na região pericentromérica, em uma região intersticial do braço q, além de um pequeno sítio terminal no braço q (FIGURAS 5e, 6).

A sequência (A)<sub>30</sub> foi localizada em sítios terminais de todos os autossomos em *M. obtusidens* dos rios Iguaçu e Piumhi e em *M. reinhardti* (FIGURA 5b, d, f). Já para os cromossomos sexuais, em *M. obtusidens* do rio Iguaçu o cromossomo Z apresentou pequenos sítios (A)<sub>30</sub> em ambas as regiões terminais e um grande acúmulo na metade proximal do braço q, enquanto o W apresentou pequenos sítios em ambas as regiões terminais, na região proximal do braço p, além de um grande acúmulo na metade distal do braço q (FIGURAS 5b, 6). Já em *M. obtusidens* do rio Piumhi, a sequência (A)<sub>30</sub> foi localizada acumulada no cromossomo Z em seu braço p e em um pequeno sítio terminal do braço q, enquanto o cromossomo W apresentou a sequência em um pequeno sítio terminal no braço p, na região pericentromérica e, na metade distal do braço q (FIGURAS 5d, 6). Para *M. reinhardti* o cromossomo Z apresentou a localização da a sequência (A)<sub>30</sub> em ambas as regiões terminais, enquanto o W apresentou um pequeno sítio terminal no braço p, além de um grande acúmulo em toda a extensão do braço q (FIGURAS 5f, 6).

#### 4 DISCUSSÃO

Os exemplares das duas populações de *M. obtusidens* (rios Iguaçu e Piumhi) e de *M. reinhardti* detêm um conservadorismo do 2n, das fórmulas cromossômicas e, da presença dos cromossomos sexuais Z e W com morfologia semelhantes, corroborando com os dados citogenéticos deste gênero de Anostomidae (GALETTI JR; LIMA; VENERE, 1995; VENERE et al., 2004; PARISE-MALTEMPI et al., 2007, 2013; DULZ et al., capítulo 2). *Megaleporinus* é o único grupo de Anostomidae que detêm a sinapomorfia da presença de cromossomos sexuais diferenciados (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017), e grande conservadorismo cariotípico interespecífico. Entretanto, os dados deste estudo para a localização dos TEs *Rex1*, *Rex3*



e *Gypsy* e, das repetições *in tandem* (TTAGGG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub> demonstraram algumas pequenas diferenças nos autossomos das populações/espécies estudadas. Além das diferenças para os sítios/acúmulos de regiões repetitivas autossômicas, o sexuais Z e W apresentaram uma alta taxa de modificação de localização dos sítios repetitivos para a organização da cromatina de seus cromossomos sexuais, os quais apresentam morfologia interespecífica similar.

A origem comum dos cromossomos Z e W em *Megaleporinus* foi proposta devido as suas semelhanças morfológicas entre todas as espécies estudadas citogeneticamente (BARROS et al., 2018). Nas duas populações de *M. obtusidens* e em *M. reinhardti* as mesmas sequências repetitivas foram localizadas nos cromossomos sexuais, corroborando com a origem comum. Contudo, a localização diferenciada dos sítios e os diferentes padrões de acúmulo demonstraram uma alta dinâmica de movimentação de sequências repetitivas que ocorreram independentes na diferenciação das linhagens.

Uma das propostas amplamente aceitas para a origem e diversificação dos cromossomos sexuais propõe um acúmulo rápido de TEs adjacentes à região sexo-específica no cromossomo Y ou W (STEINEMANN; STEINEMANN, 1998). Este acúmulo TE expande uma pequena região cromossômica formando um proto-Y ou proto-W e, desta forma, dá início a restrição da recombinação com seu homólogo X, ou Z. Em uma próxima etapa, estas áreas do proto-Y ou proto-W podem se expandir e modificar drasticamente o tamanho do cromossomo heteromórfico e levar a modificação da estrutura da cromatina de eucromática à heterocromática (STEINEMANN; STEINEMANN, 1998; CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005). As sequências TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* foram localizadas nos cromossomos sexuais Z e W de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Este é o primeiro estudo de localização *in situ* do TE *Gypsy* em Anostomidae. No entanto, a localização dos TEs *Rex1* e *Rex3* já foi demonstrada no cromossomo W de *M. elongatus*, *M. macrocephalus* e *M. obtusidens* (população do rio Mogi-Guaçu – bacia hidrográfica isolada dos demais *M. obtusidens* analisados neste estudo) (SPLENDORE DE BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013). Estes achados permitem inferir a presença dos TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* na origem dos cromossomos Z e W de *Megaleporinus*.

Em um estudo de genômica e citogenética para detecção da origem e diferenciação dos cromossomos sexuais em *Apareiodon* (Parodontidae), grupo irmão à Anostomidae, Schemberger et al. (submetido para publicação) demonstraram a presença



dos TEs *Tc1-Mariner*, *EnSpm* e *Helitron* na região repetitiva restrita ao cromossomo W. Os TEs *Rex* e *Gypsy* também foram detectados no genoma de *Apareiodon* (SCHEMBERGER et al., submetido para publicação), porém suas repetições nos cromossomos sexuais foram dispersas (NASCIMENTO, 2019). Estes estudos comparados aos resultados obtidos em *Megaleporinus* destacam a importância dos TEs na origem de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais. Contudo, a invasão de TEs de tipos diferentes entre as linhagens proporcionaram as origens independentes dos cromossomos sexuais em Parodontidae e Anostomidae.

Alguns autores propuseram que as consequências da perda parcial da recombinação em regiões sexo-específico favoreceram a ocorrência de mutações adicionais, como a amplificação de sequências de DNA repetitivo e o acúmulo de heterocromatina no cromossomo, possibilitando a contínua diferenciação morfológica do cromossomo heteromórfico (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005; BACHTROG, 2006). Nesta via, se os TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* participaram da origem da formação do proto-W na linhagem ancestral de *Megaleporinus*, durante sua diferenciação, acúmulos destes TEs ocorreram de maneira linhagem específica. Estes acúmulos diferenciais levaram as diferenças na localização destes TEs observados nas linhagens estudadas de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Entre os três TEs localizados *in situ*, o elemento *Gypsy* foi o que apresentou maior abundância nos cromossomos sexuais. Os TEs *Rex1* e *Rex3* são amplamente estudados em peixes Neotropicais (SCZEPANSKI et al., 2013; SPLENDORE DE BORBA; SILVA; PARISE-MALTEMPI, 2013; YANO et al., 2014), onde geralmente mostram localização nas regiões terminais dos cromossomos. Já o TE *Gypsy* possui mapeamento cromossômico restrito a cinco espécies de Parodontidae, com localização dispersa nos cromossomos (NASCIMENTO, 2019).

Com o acúmulo dos TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* e consequente expansão do tamanho do cromossomo W de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*, dentro da proposta da diferenciação dos cromossomos sexuais (STEINEMANN; STEINEMANN, 1998; CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005), as linhagens de *Megaleporinus* diferenciaram e modificaram a estrutura da cromatina de eucromática à heterocromática no cromossomo W. Alguns estudos propõem a gênese de expansões microsatélites internos à cópias de TEs (WILDER; HOLLOCHER, 2001; NASCIMENTO, 2019). Localizações compatíveis entre os TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* e as repetições *in tandem* (GATA)<sub>n</sub>, (CA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub> são visualizadas para a região

heterocromática do W das espécies e são compatíveis com a proposta da gênese de repetições microssatélites internas a elementos transponíveis.

Em outros organismos foi proposto que o grande acúmulo de sequências microssatélites nos cromossomos sexuais heteromórficos advém de sua possibilidade de formar estruturas tríplex (FRANK-KAMENETSKII; MIRKIN, 1995) e, que estes estão envolvidos na formação de corpos heterocromáticos no cromossomo W (SAITOH et al., 1991; KOMISSAROV et al., 2018; NASCIMENTO, 2019). Em *Apareiodon* foi demonstrada a origem das expansões microssatélites (GA)<sub>n</sub> e (TA)<sub>n</sub> a partir do TE EnSpm e, que estas sequências poderiam atuar na formação da heterocromatina do cromossomo W (NASCIMENTO, 2019). Em via similar, algumas das expansões microssatélites visualizadas nos cromossomos W das espécies de *Megaleporinus* estudadas poderiam atuar na formação dos corpos heterocromáticos para esta etapa da diferenciação dos seus cromossomos sexuais.

Recentemente, dados de sequenciamento de baixa cobertura permitiram identificar 22 DNAs satélites no cromossomo W de *M. macrocephalus* (UTSUNOMIA et al., 2019). Estes autores visualizaram também que dez destes satélites foram compartilhados com o cromossomo W de *M. obtusidens* (UTSUNOMIA et al., 2019). Alguns DNAs satélites têm proposta de origem a partir da diferenciação de partes de TEs (EVGEN'EV et al., 1982; ZELENTSOVA et al., 1986; HEIKKINEN et al., 1995; KAPITONOV; HOLMQUIST; JURKA, 1998; NASCIMENTO, 2019). Com isso, é possível que parte dos TEs presentes no cromossomo W de *Megaleporinus* possam ter deteriorado suas sequências na formação de repetições *in tandem*. A partir de dados genômicos em *Apareiodon*, Schemberger et al. (submetido para publicação) descreveram a região repetitiva do cromossomo W composta por TEs, microssatélites e satélites, as quais organizam a heterocromatina. Em *Megaleporinus*, embora não existem montagens genômicas de boa cobertura para este tipo de avaliação, é provável que alguns tipos de DNAs satélites presentes no cromossomo W tenham origem da deterioração molecular de TEs.

Em ambas as populações de *M. obtusidens* e em *M. reinhardti* foram detectados vestígios de sequências (TTAGGG)<sub>n</sub> em região intersticial (ITS) no braço longo do cromossomo W, em diferentes padrões de intensidade. As localizações dos ITSs são compatíveis com regiões de acúmulo dos TEs *Rex3* e *Gypsy*, os quais também ocupam a região telomérica do W. Estas localizações compartilhadas entre TEs e telômero indicam uma provável inversão mediada por estes retrotransposons por

mecanismo de *non-allelic homologous recombination* (para uma revisão ver LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). Em outra via, a presença do ITS no cromossomo W pode ser resultado de quebras da dupla fita (DSB) e mecanismo de *reparo por non-homologous end joining* (NHEJ) com telomerase associada, NHEJ alternativa (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

Os dados deste estudo mostraram que diferentes classes de DNAs repetitivos (TEs e repetições *in tandem*) participaram da origem e diferenciação dos cromossomos W em *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Estes DNAs repetitivos estão acumulados principalmente na região heterocromática do cromossomo W com um padrão particular de distribuição nos cromossomos sexuais das populações/espécies estudadas. Este resultado sugere que embora os cromossomos sexuais Z e W de *Megaleporinus* compartilhem uma origem comum, as etapas posteriores de diferenciação dos cromossomos sexuais seguem caminhos evolutivos distintos em cada linhagem. Ainda, devido a alta taxa de modificação nos cromossomos sexuais, estes podem ter auxiliado na geração da incompatibilidade reprodutiva e especiação em *Megaleporinus*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença número: 10538-1 para coleta de espécimes na natureza). O estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, - código de financiamento 001) e, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se organizadas no final da tese.

TABELA 1 - Conjunto de primers utilizadas para obtenção das sequências repetitivas *Rex1*, *Rex3*, Gypsy, (GATA)<sub>n</sub> e (TTAGGG)<sub>n</sub>.

Identificação	Sequência dos primers (5' - 3')	Referências
<i>Rex1</i> -RTX1-F1	TTCTCCAGTGCCTTCAACACC	Volff et al. (1999, 2000)
<i>Rex1</i> -RTX1-R1	TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC	
<i>Rex3</i> -RTX3-F1	CGGTGAYAAA GGGCAGCCCTG	Volff et al. (1999, 2000)
<i>Rex3</i> -RTX3-R1	TGGCAGACNG GGGTGGTGGT	
Gypsy P1-F	GCTAGCAAGTGGTCTCTATGAA	Nascimento (2019)
Gypsy P6-R	GGGGAGGGCCTAAGAGTA	
(GATA) <sub>n</sub>	(GATA) <sub>7</sub> (TATC) <sub>7</sub>	Traldi et al. (2013)
(TTAGGG) <sub>n</sub>	(TTAGGG) <sub>5</sub> (CCCTAA) <sub>5</sub>	Ijdo et al. (1991)

FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 1 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de RTE *Rex1* e *Rex3*. Escala da barra=10  $\mu$ m.

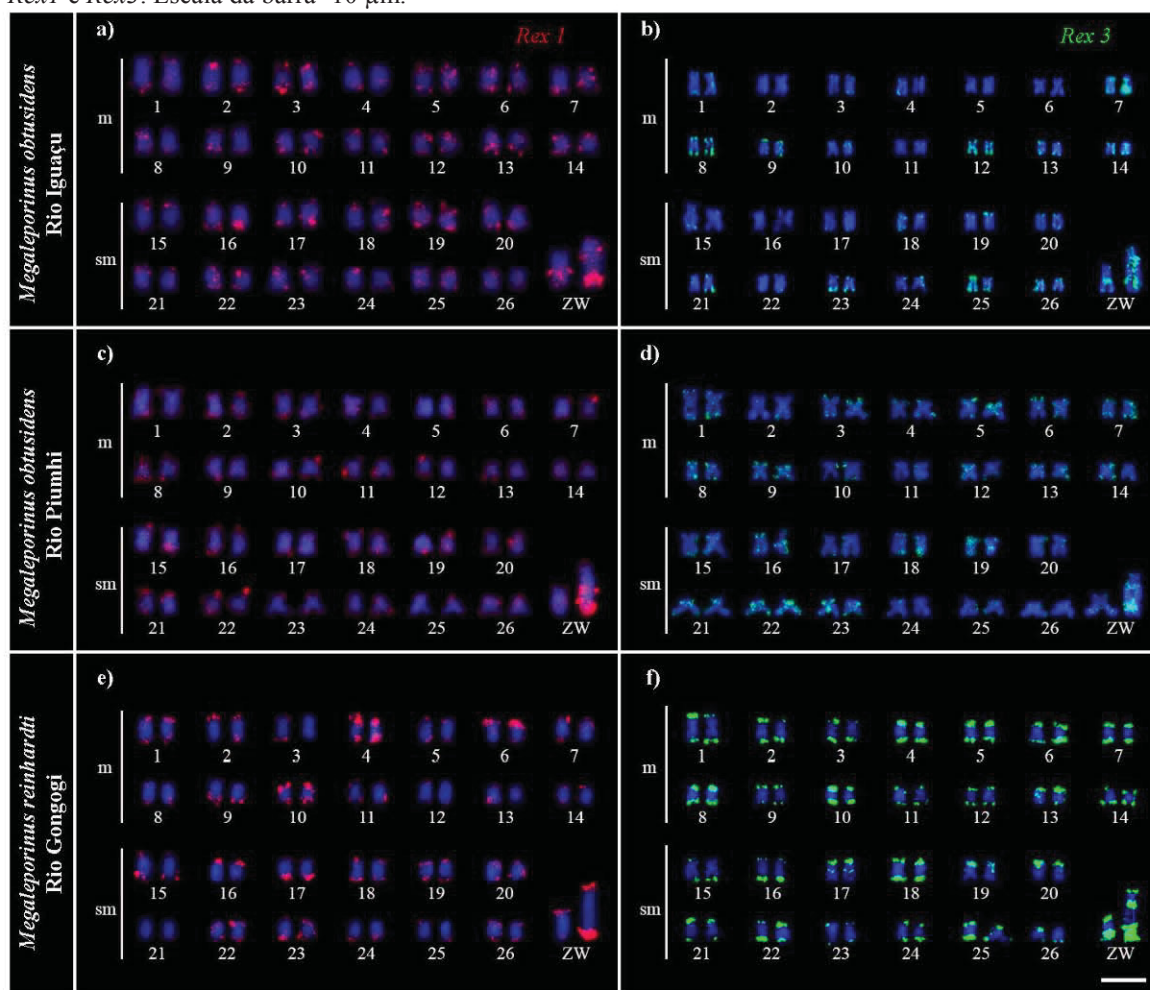


FIGURA 2 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sonda do RTE *Gypsy*. Escala da barra=10  $\mu$ m.

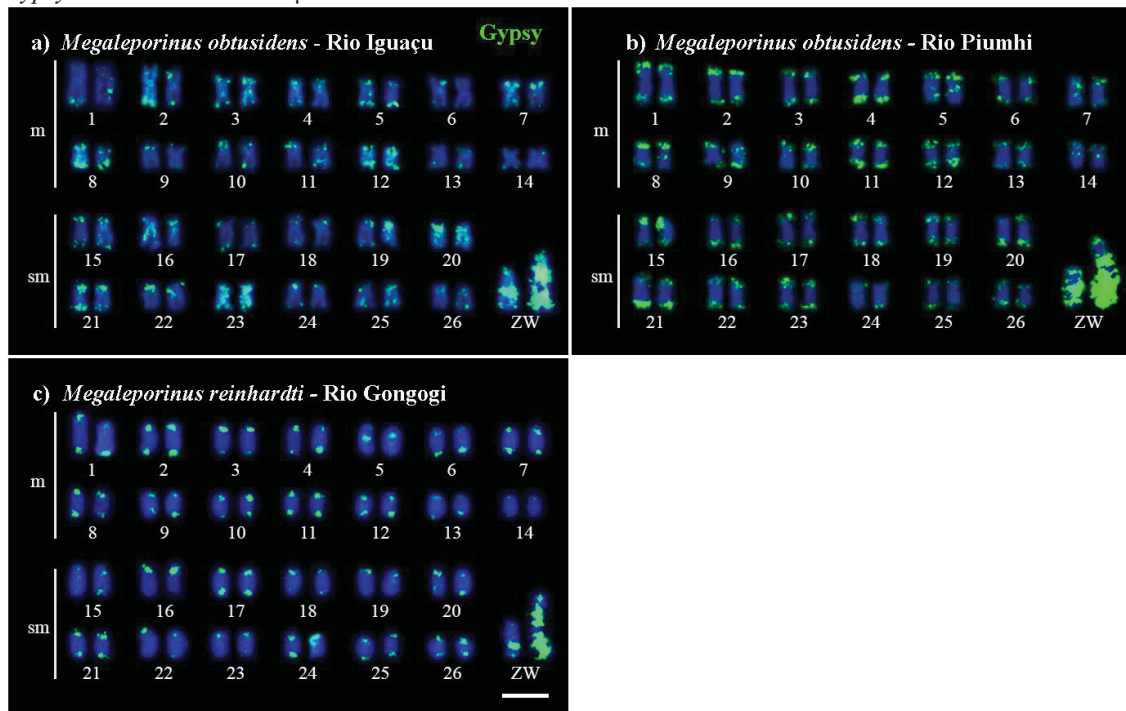


FIGURA 3 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sonda de (TTAGGG)<sub>n</sub>. Escala da barra=10  $\mu$ m.

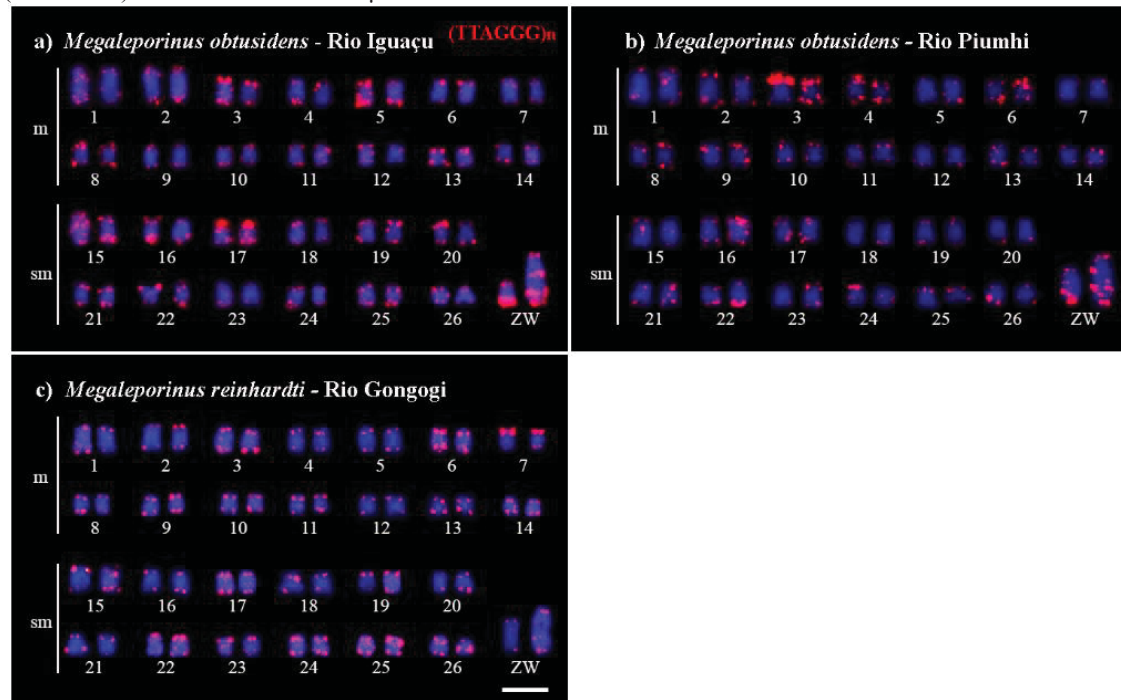




FIGURA 4 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de microssatélites (GATA)<sub>n</sub> e (GA)<sub>15</sub>. Escala da barra=10  $\mu$ m.

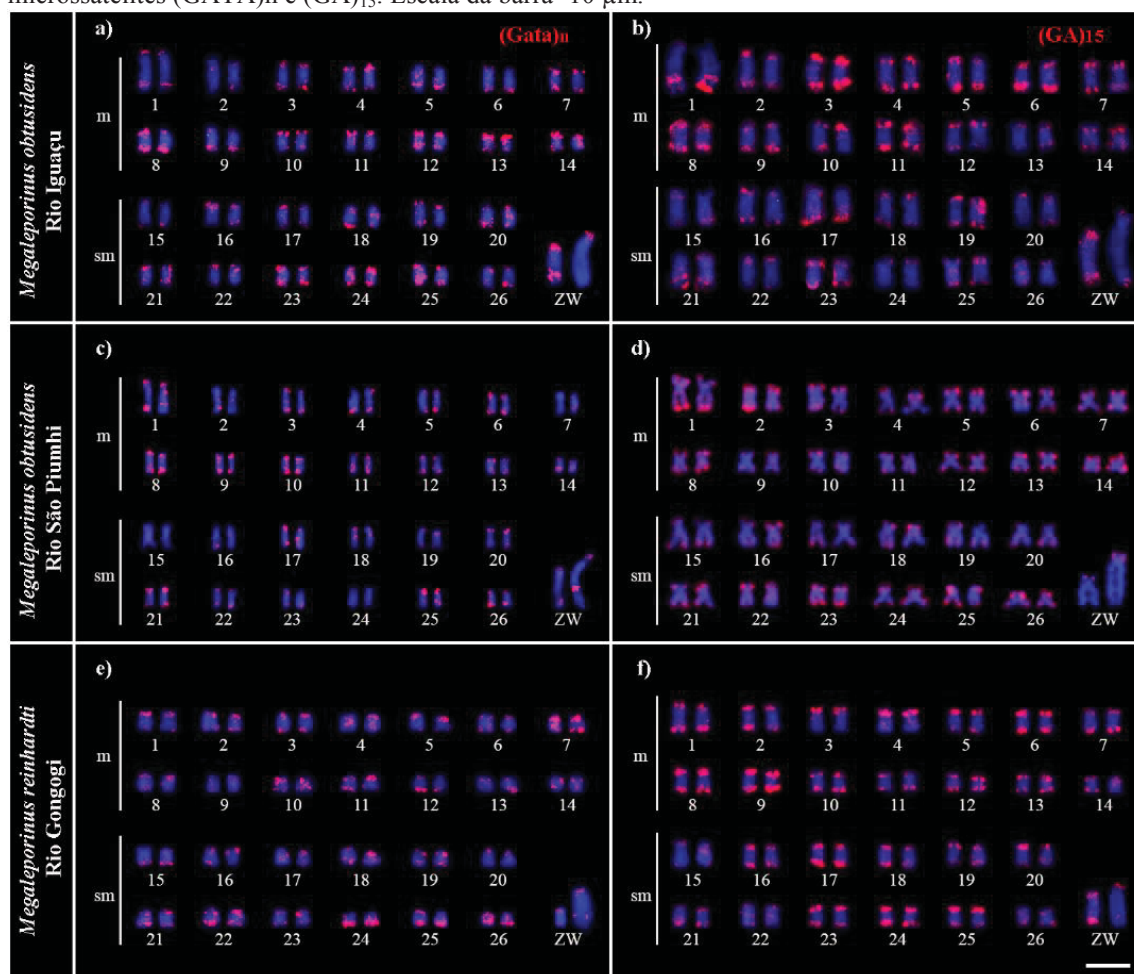




FIGURA 5 - Cariótipos de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com sondas de microssatélites (CA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub>. Escala da barra=10 µm.

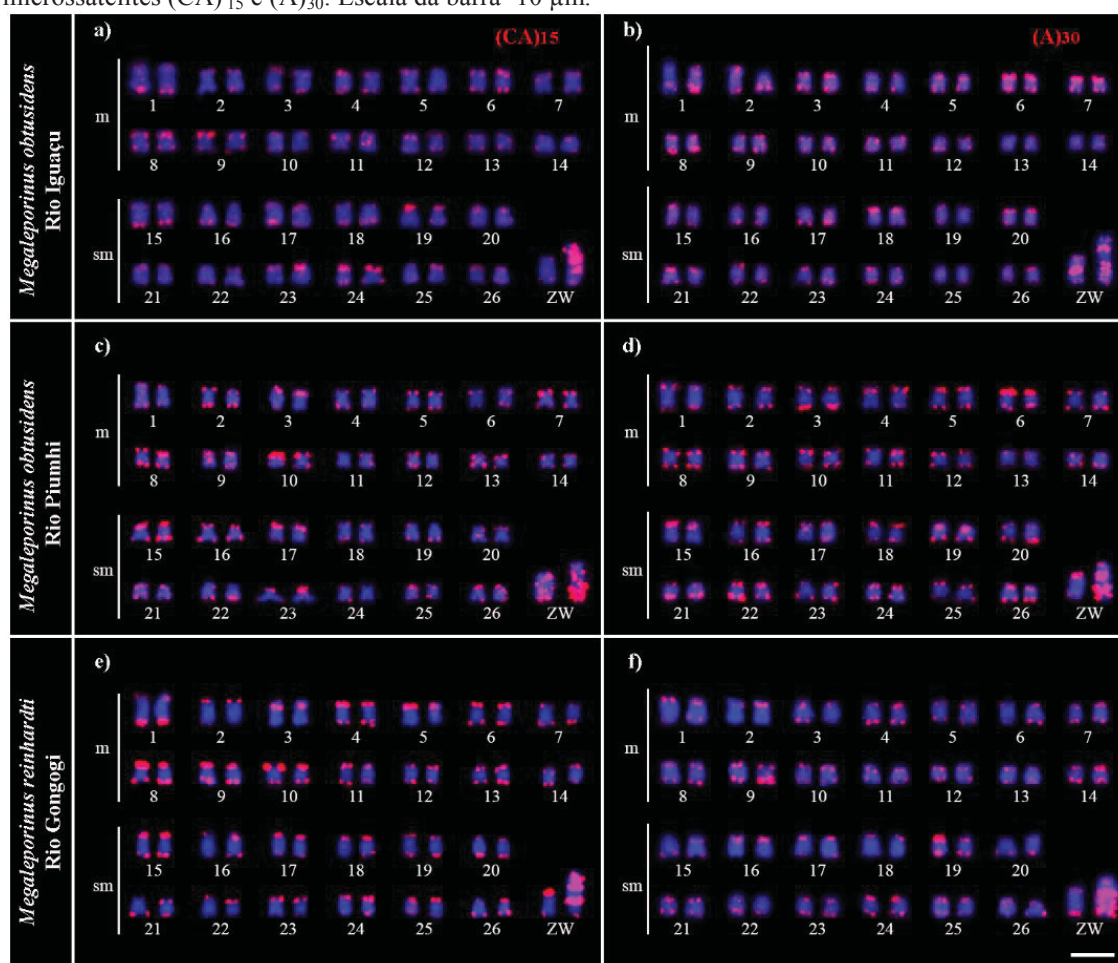
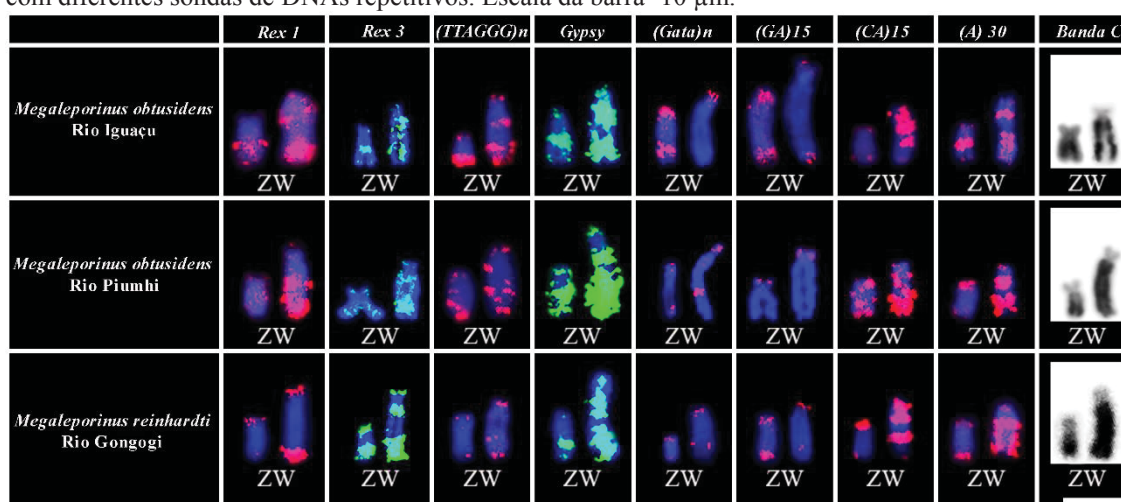


FIGURA 6 - Comparação do cromossomo Z e W de *Megaleporinus* após hibridização *in situ* fluorescente com diferentes sondas de DNAs repetitivos. Escala da barra=10 µm.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo mostram que apesar do conservadorismo quanto ao  $2n$  para a família Anostomidae, pequenas diferenças nas fórmulas cariotípicas foram observadas entre as espécies dos gêneros *Leporinus*, *Leporellus* e *Megaleporinus*, possivelmente resultantes de rearranjos cromossômicos.

As variações interespecíficas para o padrão de distribuição de heterocromatina de *L. vittatus* e de *L. friderici* podem ser explicadas pelo fato da heterocromatina ser constituída por sequências repetitivas, as quais estão sujeitas a mecanismos de recombinação homóloga, invasão de TEs ou deslizamento de replicação para expansões de microssatélites, resultando em tais variações. Em outra via, estes mecanismos estão relacionados com o acúmulo de heterocromatina em todo o braço longo do cromossomo W, e na região terminal do braço longo do Z, das espécies de *Megaleporinus*.

A localização e o número de sítios cromossômicos dos genes ribossômicos mostraram que esses sítios também estão envolvidos na diversificação cariotípica microestrutural de Anostomidae. Possivelmente eles são resultantes de prováveis transposições, translocações e/ou inversões cromossômicas.

A localização de um único sítio para snRNA U1 e U2, é condição conservada, no entanto, verificamos um intenso dinamismo de movimentação os snRNA U1 e U2 nos genomas de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*, com sítios dispersos por todos os cromossomos, inclusive os sexuais. É possível que os snRNA estejam associados com elementos transponíveis ou que os TEs com segmentos internos similares a um tipo de snRNA, sejam os responsáveis pelo padrão disperso observado.

O posicionamento do RTE *Rex* e de sequências *in tandem* nas regiões terminais da maioria dos cromossomos dos anostomídeos analisados, podem estar relacionadas com o mecanismo de transposições e reparo de DNA por recombinação não homóloga, comum durante a configuração Rabl da divisão celular.

Neste estudo foi proposto que os TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* participaram da origem da formação do proto-W em uma linhagem ancestral de *Megaleporinus*, e durante sua diferenciação, acúmulos destes TEs ocorreram de maneira específica em cada linhagem, resultando no acúmulo diferencial destes TEs, observados nas linhagens estudadas de *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. Visto que, outros estudos relacionam a origem dos cromossomos sexuais com a perda parcial da recombinação em regiões

sexo-específico, favorecendo o acúmulo de sequências de DNA repetitivo e de heterocromatina nestes cromossomos.

As localizações compatíveis entre os TEs *Rex1*, *Rex3* e *Gypsy* e as repetições *in tandem* (GATA)<sub>n</sub>, (CA)<sub>15</sub> e (A)<sub>30</sub> foram visualizadas na região heterocromática do W das espécies de *Megaleporinus* e são concordantes com a proposta da gênese de repetições microssatélites internas a elementos transponíveis.

A presença de ITS no cromossomo W compartilhada com TEs indica uma provável inversão mediada por estes TEs por mecanismo de *non-allelic homologous recombination* ou os ITS podem ser resultados de quebras da dupla fita (DSB) e mecanismo de *reparo por non-homologous end joining* (NHEJ) com telomerase associada, NHEJ alternativa.

Por fim, o padrão de distribuição das diferentes classes de DNAs repetitivos (TEs e repetições *in tandem*) permite inferir sobre a sua participação na origem e diferenciação dos cromossomos W em *M. obtusidens* e *M. reinhardti*. O acúmulo diferencial destes DNAs nas regiões heterocromáticas do cromossomo W sugere que embora os cromossomos sexuais Z e W de *Megaleporinus* compartilhem uma origem comum, as etapas posteriores de diferenciação dos cromossomos sexuais seguem caminhos evolutivos distintos em cada linhagem.

## REFERÊNCIAS

- ABUÍN, M.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in four salmonid species. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 5, p. 1035–1038, 1996.
- AGUILAR, C. T.; GALETTI JR, P. M. Chromosome mapping of 5S rRNA genes differentiates Brazilian populations of *Leporellus vittatus* (Anostomidae, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 31, n. 1 suppl, p. 188–194, 2008.
- ALBRECHT, M. P.; PELLEGRINI-CARAMASCHI, E. Feeding ecology of *Leporinus taeniofasciatus* (Characiformes: Anostomidae) before and after installation of a hydroelectric plant in the upper rio Tocantins, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 53–60, 2003.
- ALVIM, M. C. C.; PERET, A. C. Food resources sustaining the fish fauna in a section of the upper São Francisco River in Três Marias, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n. 2, p. 195–202, 2004.
- ARKHIPOVA, I. R. et al. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 2, p. 123–124, 2003.
- ARTONI, R. F.; et al. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 39–44, 1999.
- BACHTROG, D. A dynamic view of sex chromosome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 16, n. 6, p. 578–585, 2006.
- BARBOSA, P. et al. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 143, n. 1, p. 55–62, 2015.
- BARBOSA, P. et al. Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 15, n. 1, 2017.
- BARROS, A. V. et al. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, Amsterdam, v. 608, p. 20–27, 2017.
- BARROS, L. C. **Isolamento, caracterização e mapeamento cromossômico de elementos repetitivos em espécies da família Anostomidae (Ostariophysi – Characiformes): análise comparativa em diferentes tipos de águas amazônicas**, 2017. 109f. Tese (Doutorado Genética, Conservação e Biologia Evolutiva), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.
- BARROS, L. C.; GALETTI JR, P. M.; FELDBERG, E. Mapping 45S and 5S ribosomal genes in chromosomes of *Anostomidae* fish species (Ostariophysi, Characiformes) from

different Amazonian water types. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 789, n. 1, p. 77–89, 2017.

BARROS, L. C. et al. Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Sexual Development**, Basel, v. 12, n. 4, p. 204–209, 2018.

BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 103–120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C. et al. The X 1 X 2 Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C-and chromosome replication banding. **Chromosome research**, Oxford, v. 5, n. 7, p. 493–499, 1997.

BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, Oxford, n. 8, p. 603–613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. et al. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity**, Basingstoke, v. 93, n. 2, p. 228–233, 2004.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, London, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 2006.

BIESSMANN, H. et al. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences “heals” broken chromosome ends in *Drosophila*. **Cell**, Cambridge, v. 61, n. 4, p. 663–673, 1990.

BLANCO, D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, London, v. 81, n. 1, p. 351–357, 2012.

BOER, J. G. et al. Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids. **BioMed Central Genomics**, London, v. 8, n. 1, p. 422, 2007.

BÖHNE, A. et al. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 203–215, 2008.

BRITSKI, H. A.; BIRINDELLI, J. L. O. Description of a new species of the genus *Leporinus* Spix (Characiformes: Anostomidae) from the rio Araguaia, Brazil, with comments on the taxonomy and distribution of *L. parae* and *L. lacustris*. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 45–51, 2008.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2007.

BRITSKI, H. A. et al. A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 52, n. 37, p. 441–475, 2012.

BRITSKI, H. A.; GARAVELLO, J. C. Sobre *Leporinus octofasciatus* Steindachner da bacia do Paraná (Pisces, Anostomidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 1978.

BUENO, D. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B Chromosome and H3 histone spreading. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66532, 2013.

CABRAL, A. G. M. O.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. Estudos citogenéticos na família Anostomidae (Characiformes) da bacia amazônica. In: **Anais IV Jornada de Iniciação Científica do Estado do Amazonas**, n. 4, p. 176, 1995.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 279–292, 2012.

CANAPA, A. et al. Transposons, genome size, and evolutionary insights in animals. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 147, n. 4, p. 217–239, 2015.

CAO, L. et al. Identification and characterization of a LTR retrotransposon from the genome of *Cyprinus carpio* var. Jian. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 144, n. 3, p. 325–333, 2016.

CAPY, Pierre. **Dynamics and evolution of transposable elements**. North American distributor Chapman & Hall, 1998.

CARDUCCI, F. et al. Rex Retroelements and Teleost Genomes: An Overview. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 19, n. 11, p. 3653, 2018.

CARVALHO, A. B. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 12, n. 6, p. 664–668, 2002.

CAVALLINI, Z. I.; BERTOLLO, L. A. C. Indução de mitoses em *Hoplias* cf. *malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erithrinidae). In: **II Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, v.32, 1988.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, Firenze, v. 55, n. 2, p. 139–150, 2002.

CHALOPIN, D. et al. Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 567–580, 2015.



CHALOPIN, D.; VOLFF, J.-N. Analysis of the spotted gar genome suggests absence of causative link between ancestral genome duplication and transposable element diversification in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, Hoboken , v. 328, n. 7, p. 629–637, 2017.

CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. **Science**, v. 251, n. 4997, p. 1030-1033, 1991.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London , v. 371, n. 6494, p. 215–220, 1994.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, Basingstoke , v. 95, n. 2, p. 118–128, 2005.

CHEW, J. et al. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG) n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**, Wien, v. 111, n. 1, p. 45–52, 2002.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity**, Basingstoke, v. 105, n. 6, p. 554–561, 2010.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrurus erythrurus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BioMed Central Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 271, 2010.

CIOFFI, M.B. et al. Differentiation of the XY Sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development**, Basel, v. 4, n. 3, p. 176–185, 2010.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: M. A. Garrido-Ramos (Org.); **Genome Dynamics**, Basel, v. 7, p.197–221, 2012.

CIOFFI, M. B. et al. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 80, n. 6, p. 2125-2139, 2012.

CIOFFI, M. B.; et al. Chromosomal evolution in lower vertebrates: sex chromosomes in Neotropical fishes. **Genes**, Basel, v. 8, n. 10, p. 258, 2017.

COCCA, E.; IORIO, S. D.; CAPRIGLIONE, T. Identification of a novel helitron transposon in the genome of Antarctic fish. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 58, n. 3, p. 439–446, 2011.



CREPALDI, C. **Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus* a partir de sequências repetitivas**, 2019. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1990.

DULZ, T. A. et al. Comparative cytogenetics among *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements. **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 13, n. 2, p. 1–16, 2019.

EICHLER, E. E.; SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science**, New York, v. 301, n. 5634, p. 793–797, 2003.

EICKBUSH, T. FURANO, A.V. Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 12, n. 6, p. 669–674, 2002.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species of Fishes by family/subfamily**. Disponível em: <<https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>>. Acesso em: 17/04/2019.

EVGEN'EV, M. B. et al. Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila*. **Chromosoma**, Wien, v. 85, n. 3, p. 375–386, 1982.

FARRÉ, M.; BOSCH, M.; LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; PONSÀ, M.; RUIZ-HERRERA, A. assessing the role of tandem repeats in shaping the genomic architecture of great apes. (D. Liberles, Org.) **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. e27239, 2011. >.

FENOCCHIO, A. S. et al. A Cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. **Caryologia**, Firenze, v. 56, n. 2, p. 197–204, 2003.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 5, p. 397–405, 2008.

FRANK-KAMENETSKII, M. D.; MIRKIN, S. M. Triplex DNA Structures. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 65–95, 1995.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: <<https://www.fishbase.in/search.php>>. Acesso em: 15/2/2019.

GALETTI JR, P. M. et al. Karyotypic similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus* and *Shizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Genética**, v. 4, n. 1, p. 11–15, 1981a.

GALETTI JR, P. M. et al. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 29, n. 3, p. 138–142, 1981b.

GALETTI JR, P. M. et al. O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the Nucleolar Organizing Region. **Caryologia**, Firenze, v. 37, n. 4, p. 401–406, 1984.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 43, n. 1–2, p. 43–46, 1986.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationships in the phylogeny of the group. **Brazilian Journal Genetics**, v. 10, p. 135–140, 1987.

GALETTI JR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, Firenze, v. 44, n. 3–4, p. 287–292, 1991.

GALETTI JR., P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **CYTOLOGIA**, v. 60, n. 4, p. 375–382, 1995.

GALETTI JR, P. M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para conhecimento dos cromossomos de peixes. In: GUERRA M. (Org) **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae In: REIS, R.E. KULLANDER, S.O.; FERRARIS JÚNIOR, C.J. (Eds.) **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

GARCÍA-SOUTO, D. et al. Molecular cytogenetic analysis of the european hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA gene clusters map to the same location. (R. Castiglia, Org.) **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0146150, 2015.

GEMAYEL, R. et al. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 445–477, 2010.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City, New Jersey: T. F. H. Publications, Inc Ltd. 1977.

GETLEKHA, N. et al. Contrasting evolutionary paths among Indo-Pacific *Pomacentrus* species promoted by extensive pericentric inversions and genome organization of repetitive sequences. **Zebrafish**, Larchmont, v. 15, n. 1, p. 45–54, 2018.

GLUGOSKI, L.; et al. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, Amsterdam, v. 650, p. 49–54, 2018.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: Eduem, 2007.

GRAY, Y. H. M. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 461–468, 2000.

GROSS, M. C. et al. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 5, p. 1117–1127, 2010.

HASHIMOTO, D. T. et al. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 124, n. 2, p. 151–157, 2009.

HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 122, n. 3, p. 239–244, 2004.

HEIKKINEN, E. et al. The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 41, n. 5, 1995.

HENNING, F. et al. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 121, n. 1, p. 55–58, 2008.

HENNING, F. et al. Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). **Heredity**, London, v. 106, n. 2, p. 391–400, 2011.

HUA-VAN, A. et al. The struggle for life of the genome's selfish architects. **Biology Direct**, London, v. 6, n. 1, p. 19, 2011.

IJDO, J. W. et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 17, p. 4780–4780, 1991.

JEFFREYS, A. J.; MURRAY, J.; NEUMANN, R. High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 267–273, 1998.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; SMIT, A. F. Repetitive elements: detection. **Nature Encyclopedia of the Human Genome**. London: Nature Publishing Group, p.9–14, 2003.

- JURKA, J. et al. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 110, n. 1–4, p. 462–467, 2005.
- KAMALI, M. et al. An integrated chromosome map of microsatellite markers and inversion breakpoints for an asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. **Journal of Heredity**, New York, v. 102, n. 6, p. 719–726, 2011.
- KANTEK, D. L. Z. et al. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, London, v. 75, n. 2, p. 408–421, 2009.
- KAPITONOV, V. V.; HOLMQUIST, G. P.; JURKA, J. L1 repeat is a basic unit of heterochromatin satellites in cetaceans. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 15, n. 5, p. 611–612, 1998.
- KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009.
- KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 253–259, 2006.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.
- KELKAR, Y. D. et al. A matter of life or death: How microsatellites emerge in and vanish from the human genome. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 21, n. 12, p. 2038–2048, 2011.
- KOEHLER, M. R. et al. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 325–331, 1997.
- KOHANY, O. et al. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase submitter and censor. **BioMed Central Bioinformatics**, Oxford, v. 7, p. 474, 2006.
- KOJIMA, K. K. FUJIWARA, H. Cross-genome screening of novel sequence-specific Non-LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 21, n. 2, p. 207–217, 2004.
- KOJIMA, K. K.; JURKA, J. Ancient origin of the U2 small nuclear RNA gene-targeting Non-LTR retrotransposons utopia. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0140084, 2015.
- KOMISSAROV, A. S. et al. New high copy tandem repeat in the content of the chicken W chromosome. **Chromosoma**, Wien, v. 127, n. 1, p. 73–83, 2018.

KRINSKI, D.; MIYAZAWA, C. S. Análises cariotípicas em *Leporellus vittatus* e *Leporinus striatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso, Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 35, n. 486, p. 113, 2013.

LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 364–378, 2016.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, London, v. 52, n. 2, p. 201–220, 1964.

LI, J. et al. Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 133, n. 1, p. 25–33, 2011.

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Reviews in Biochemistry**, Maryland, v. 49, n. 1, p. 727–764, 1980.

LONGO, M. S. et al. Distinct retroelement classes define evolutionary breakpoints demarcating sites of evolutionary novelty. **BioMed Central Genomics**, London, v. 10, n. 1, p. 334, 2009.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dynamics**, Basel, v. 7, p. 1–28, 2012.

LORSCHIEDER, C. A. et al. Comparative cytogenetics among three sympatric hypostomus species (Siluriformes: Loricariidae): An evolutionary analysis in a high endemic region. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 61, 2018.

LUI, R. L. et al. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron**, Oxford, v. 40, n. 5–6, p. 552–559, 2009.

MACAYA-SANZ, D.; SUTER, L.; JOSEPH, J.; et al. Genetic analysis of post-mating reproductive barriers in hybridizing european populus species. **Heredity**, London, v. 107, n. 5, p. 478–486, 2011.

MAKAROV, V. L. et al. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. **Cell**, Cambridge, v. 88, n. 5, p. 657–666, 1997.

MALIMPENSA, G. C. et al. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 154, n. 2, p. 99–106, 2018.

MANCHADO, M. et al. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 79–86, 2006.

- MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 80, n. 3, p. 630–637, 2012.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, Oxford, v. 7, p. 363–367, 1999.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**, Oxford, v. 8, p. 353–355, 2000.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 903–910, 2001a.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 8, p. 439–446, 2001b.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Narrow chromosome diversity in fish of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios-Cambridge**, p. 139-148, 1997.
- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. (Ed.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publisher, 2007.
- MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. F. Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 67, n. 6, p. 594–607, 2008.
- MATERA, A. G.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 3, p. 209–220, 2007.
- MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 136, n. 3, p. 461–469, 2009.
- MENEZES, N. A. et al. **Peixes de água doce da Mata Atlântica**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- MERLO, M. A. et al. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. **Genes & Genetic Systems**, Mishima, v. 85, n. 5, p. 341–349, 2010.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI, P. M. Estudos cromossômicos em *Schizodon* (Anostomidae, Characiformes). **Ciência e Cultura**, n. 39, p. 787, 1987.



MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; MOYZIS, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 18, p. 7049–7053, 1989.

MILLER, D. A. et al. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 101, n. 2, p. 235–243, 1976.

MOLINA, W. F.; GALETTI JR, P. M. Heterochromatin and sex chromosomes in the neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, v. 94, p. 141–149, 1998.

MOLINA, W. F.; GALETTI JR, P. M. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 130, n. 2, p. 153–160, 2007.

MOLINA, W. F.; SHIBATTA, O.; GALETTI JR., P. M. Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 270–274, 2008.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, Firenze, v. 33, p. 83–91, 1980.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, Firenze, v. 46, n. 2–3, p. 115–125, 1993.

MULLER, H. J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 1, n. 1, p. 2–9, 1964.

NAKAYAMA, I. et al. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, Wien, v. 103, n. 1, p. 31–39, 1994.

NASCIMENTO, V. D. et al. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? **Zoologischer Anzeiger**, Berlin, v. 272, p. 93–103, 2018.

NASCIMENTO, V. D. **Análise do sequenciamento em larga escala na caracterização e localização in situ de elementos repetitivos no genoma de *Apareiodon* sp. (Characiformes: Parodontidae)**, 2019. 165f. Tese (Doutorado em Genética), Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2019.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 121–152, 2005.



- NELSON, J. S.; GRANDE, T.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 5. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.
- NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? **BioEssays**, Cambridge, v. 25, n. 12, p. 1147–1149, 2003.
- OHNO, S. **Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes**. Berlin: Springer Berlin, 2014.
- OJIMA, Y.; HAYASHI, M.; UENO, K. A review of the chromosome numbers in fishes. **Kromosomo**, Japan, v.1, p.19-47, 1976.
- OKAZAKI, S. et al. Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 15, n. 8, p. 4545–4552, 1995.
- OLIVEIRA, C. et al. TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.
- OLIVEIRA, C. et al. Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. **Caryologia**, Firenze, v. 56, n. 2, p. 181–189, 2003.
- OLIVEIRA, R. R. et al. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 134, n. 2, p. 243, 2008.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 81–100, 2009.
- OZOUF-COSTAZ, C. et al. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, n. 1, p. 51–57, 2004.
- PARISE-MALTEMPI, P. P. et al. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 116, n. 3, p. 218–223, 2007.
- PARISE-MALTEMPI, P. et al. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BioMed Central Genetics**, London, v. 14, n. 1, p. 60, 2013.
- PASTORI, M. C.; FENOCCHIO, A. S.; LÓPEZ, P. A. First description of microchromosome in the Anostomidae fish *Schizodon nasutus* from Argentina. **Brazilian Journal of Genetics**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 425–427, 1997.

- PENDÁS, A. M. et al. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel , v. 67, n. 1, p. 31–36, 1994.
- PEREIRA, M. A. et al. Cytogenetic and nuclear DNA content analysis in Anostomidae fishes from the Sapucaí River, Minas Gerais State, Brazil. **Cytologia**, v. 67, n. 3, p. 289–296, 2002.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.
- PISCOR, D.; CENTOFANTE, L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Highly similar morphologies between chromosomes bearing U2 snRNA gene clusters in the group *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae): an evolutionary approach in species with  $2n = 36, 46, 48$ , and  $50$ . **Zebrafish**, Larchmont, v. 13, n. 6, p. 565–570, 2016.
- POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BioMed Central Genetics**, London, v. 12, n. 1, p. 90, 2011.
- POLTRONIERI, J. et al. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel , v. 142, n. 1, p. 40–45, 2014.
- PONZIO, J. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal locations of U2 snDNA clusters in *Megaleporinus*, *Leporinus* and *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Biologia**, v. 73, n. 3, p. 295–298, 2018.
- PORTO-FORESTI, F. et al. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 195–202, 2008.
- PUCCI, M. B. et al. Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers: population differentiation in *Characidium*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 3, p. 541–553, 2014.
- PUCCI, M. B. et al. Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel v. 149, n. 3, p. 182–190, 2016.
- PUCCI, M. B. et al. Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 585–592, 2018.

QVARNSTRÖM, A.; BAILEY, R. I. Speciation through evolution of sex-linked genes. **Heredity**, Basingstoke, v. 102, n. 1, p. 4–15, 2009.

RAMIREZ, J. L. et al. Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis: testing monophyly in *Leporinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 88, n. 3, p. 1204–1214, 2016.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; GALETTI JR., P. M. A new genus of *Anostomidae* (Ostariophysi: Characiformes): Diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 107, p. 308–323, 2017.

RAMIREZ, J. L. et al. Revealing hidden diversity of the underestimated Neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 8, p. 149, 2017.

REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of Fish: state of the art. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 141, n. 2–3, p. 103–113, 2013.

REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America: Fish biodiversity and conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.

ROCCHI, M. et al. Centromere repositioning in mammals. **Heredity**, Basingstoke, v. 108, n. 1, p. 59–67, 2012.

SAITOH, Y. et al. Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent-repetitive sequences. **Chromosoma**, Wien, v. 101, n. 1, p. 32–40, 1991.

SANTOS, G. M. Caracterização, hábitos alimentares e reprodutivos de quatro espécies de “Aracus” e considerações sobre o grupo no lago Janauacá – AM. (Osteichthyes, Caracoidei, Anostomidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 4, p. 713–739, 1982.

SANTOS, G. M.; JÉGU, M. Novas ocorrências de *Gnathodolus bidens*, *Synaptolaemus cingulatus* e descrição de duas espécies novas de *Sartor* (Characiformes, Anostomidae). **Amazoniana**, Manaus, v. 10, p. 181–186, 1987.

SCACCHETTI, P. C. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 146, n. 2, p. 136–143, 2015.

SCHEEL, J. J. Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Danmarks Akvarium**, v. 22, 1973.

SCHEMBERGER, M. O. et al. DNA transposons invasion and microsatellites accumulation guide the W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, Wien, Subject to publication.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in *Parodontidae* (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 139, n. 11–12, p. 1499–1508, 2011.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Construction and characterization of a repetitive DNA library in *Parodontidae* (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, Larchmont, v. 11, n. 6, p. 518–527, 2014.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in *Parodontidae* fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, Amsterdam, v. 593, n. 2, p. 308–314, 2016.

SCHUELER, M. G. et al. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, New York, v. 294, n. 5540, p. 109–115, 2001.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: **Chromosomes today**. Springer, Dordrecht, 1987. p. 61–74.

SCZEPANSKI, T. S. et al. Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 141, n. 4, p. 309–316, 2013.

SERRANO, É. A.; et al. Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 11, n. 1, p. 81–95, 2017.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 154, n. 1, p. 70–210, 2008.

SILVA, D. M. Z. A. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 146, n. 2, p. 144–152, 2015.

SILVA, E. L.; DE BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular cytogenetics**, London, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the Nucleolus Organizer Region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 139, n. 1, p. 22–28, 2013.

SILVA-SANTOS, R. et al. Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus* cf. *friderici*. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 9, p. 47, 2018.

SONAY, T. B. et al. Tandem repeat variation in human and great ape populations and its impact on gene expression divergence. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v. 25, n. 11, p. 1591-1599, 2015.

SOTERO-CAIO, C. G. et al. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 161–177, 2017.

SPLENDRE DE BORBA, R.; LOURENÇO DA SILVA, E.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus Spix*, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. **Mobile Genetic Elements**, Austin, v. 3, n. 6, p. e27460, 2013.

STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 102–103, n. 1–6, p. 409–420, 1998.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 110, n. 1–4, p. 134–143, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, New York, v. 75, n. 1, p. 304–306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Malden: Blackwell Publishing, 2003.

SUTHERLAND, G. R.; BAKER, E.; RICHARDS, R. I. Fragile sites still breaking. **Trends in genetics**, Amsterdam, v. 14, n. 12, p. 501–506, 1998.

SYMONOVÁ, R. et al. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BioMed Central Evolutionary Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 42, 2013.

TAKAHASHI, H.; et al. A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the Silkworm, *Bombyx mori*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 8, p. 1578–1584, 1997.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, n. 10, p. 4127–4138, 1984.

TERENCIO, M. L. et al. Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): A fish model for sex chromosome differentiation. **Sexual Development**, Basel, v. 7, n. 6, p. 325–333, 2013.

TIMBERLAKE, W. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, New York, v. 202, n. 4371, p. 973–975, 1978.

- TRALDI, J. B. et al. Physical mapping of (GATA) *n* and (TTAGGG) *n* sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Genetics**, London, v. 92, n. 1, p. 127–130, 2013.
- UGARKOVIĆ, Đ.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Eynsham, v. 21, n. 22, p. 5955–5959, 2002.
- UTSUNOMIA, R. et al. Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 142, n. 4, p. 286–292, 2014.
- UTSUNOMIA, R. et al. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, 2019.
- VALENTE, G. T. et al. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 133, n. 1, p. 34–42, 2011.
- VALENTIM, F. C. S. et al. Caracterização cromossômica de algumas espécies da família Anostomidae (Pisces, Characiformes) da bacia amazônica central. In: **Anais do V Jornal Científico da Amazônia**, p. 72, 1996.
- VENERE, P. C. **Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi)**, 1998. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.
- VENERE, P. C.; et al. A Novel ZZ/ZW Sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 121, n. 1, p. 75–80, 2004.
- VENERE, P. C.; GALETTI, P. M. Aspectos citogenéticos em anostomídeos da região amazônica. **Ciência e Cultura**, p. 934, 1986a.
- VENERE, P. C.; GALETTI, P. M. Estudos cromossômicos em *Leporinus* (Anostomidae) de diferentes bacias hidrográficas. In: **Anais do I Simpósio de Citogenética Aplicada Peixes Neotrópicos**, p. 62, 1986b.
- VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 5, p. 1094–1116, 2010.
- VICENTE, V. E. et al. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G-and C-banding. **Genetica**, 's-Gravenhage, v. 119, n. 2, p. 115–120, 2003.



- VOLFF, J. N. et al. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, New York , v. 16, n. 11, p. 1427–1438, 1999.
- VOLFF, J.-N. et al. Multiple lineages of the Non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 17, n. 11, p. 1673–1684, 2000.
- VOLFF, J.-N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 9, p. 913–922, 2006.
- WALSH, J. B.; STEPHAN, W. Multigene families: evolution. **e LS** (Ed.), 2008.
- WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, London , v. 8, n. 12, p. 973–982, 2007.
- WICHMAN, H. A. et al. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**, Basingstoke, v. 82, n. 5, p. 369–377, 1991.
- WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile Elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 18, n. 3, p. 384–392, 2001.
- YANO, C. F. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e90946, 2014.
- YANO, C. F. et al. Chromosome dynamics in *Triporthus* species (Characiformes, Triporthidae): An ongoing process narrated by repetitive sequences. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 107, n. 4, p. 342–348, 2016.
- ZELENTSOVA, E. S. et al. Dispersed repeats in *Drosophila virilis*: elements mobilized by interspecific hybridization. **Chromosoma**, Wien, v. 93, n. 6, p. 469–476, 1986.
- ZHOU, Q. A swimy locus on Y chromosome of the platyfish (*Xiphophorus maculatus*) is derived from a novel DNA transposon Zisupton. **Gene**, Amsterdam ,v. 503, n. 2, p. 254–259, 2012.
- ZIEMNICZAK, K. et al. In situ localization of (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel , 144, n. 4, p. 325–332, 2014.
- ZOU, S. et al. The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 integrates preferentially into regions of silent chromatin at the telomeres and mating loci. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 5, p. 634–645, 1996.



ZUANON, J. **História Natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará.** Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

## APÊNDICE 1

TABELA 1 – Locais de coleta das espécies de Anostomidae analisadas no presente estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Rio</b>	<b>Bacia hidrográfica</b>	<b>Cidade/Estado</b>	<b>Localização-GPS</b>
<i>Leporinus friderici</i> e <i>Leporellus vittatus</i>	Rio Mogi-Guaçu	Bacia do Alto rio Paraná	Mogi-Guaçu-SP	(21°58'52" S, 47°17'36" W)
<i>Leporinus friderici</i>	Rio Jangada	Bacia do rio Iguaçu	Porto Vitória-PR	(26°13'5.22" S, 51°16'17.40" W)
<i>Leporellus vittatus</i>	Rio Aripuanã River	Bacia rio Aripuanã	MT	(10°09'57.8" S, 59°26'54.9" W)
<i>Leporellus vittatus</i> e <i>Megaleporinus obtusidens</i>	Rio Piumhi	Bacia do rio São Francisco	Piumhi - MG	(20°16'15" S, 45°55'39 "W)
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	Rio Iguaçu	Bacia do rio Iguaçu	União da Vitória-PR	(26°13'5.22"S, 51°16'17.40"O)
<i>Megaleporinus reinhardti</i>	Rio Gongogi	Bacia do rio Gongogi	Dario Meira-BA	(14°28'13.1"S, 39°57'33.1"O)

FONTE: O autor (2019).

## APÊNDICE 2

TABELA 2 - Conjunto de primers utilizadas para obtenção das sequências repetitivas utilizadas no presente estudo.

Identificação	Sequência dos primers (5' - 3')	Referências
rDNA 18S- Fw	CCGCTTTGGTGACTCTTGAT	Gross et al. (2010)
rDNA 18S-Rw	CCGAGGACCTCACTAAACCA	
rDNA 5S-5SA	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Martins e Galetti (1999)
rDNA 5S-5SB	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA	
snRNA U1- ColU1F	CTTACCTGGCGTRGRGGWY	Cabral-de-Mello et al. (2012)- REF
snRNA U1-ColU1R	CAKTCRRCTACCAAAAATT	
snRNA U2- U2F	ATCGCTTCTCGGCCTTATG	Bueno et al. (2013)
snRNA U2- U2R	TCCCGGCGGTACTGCAATA	
<i>Rex1</i> -RTX1-F1 <i>Rex1</i> -RTX1-R1	TTCTCCAGTGCCTTCAACACC TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC	Volff et al. (1999, 2000)
<i>Rex3</i> -RTX3-F1 <i>Rex3</i> -RTX3-R1	CGGTGAYAAA GGGCAGCCCTG TGGCAGACNG GGGTGGTGGT	
Gypsy P1-F	GCTAGCAAGTGGTCTCTATGAA	Nascimento (2019)
Gypsy P6-R	GGGGAGGGCCTAAGAGTA	
(GATA) <sub>n</sub>	(GATA) <sub>7</sub> (TATC) <sub>7</sub>	Traldi et al. (2013)
(TTAGGG) <sub>n</sub>	(TTAGGG) <sub>5</sub> (CCCTAA) <sub>5</sub>	

FONTE: O autor (2019).

## ANEXO 1

## Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1		Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

## Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

## Taxões autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

## Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Felíes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

## ANEXO 2

**Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 011/2017**

Protocolo UEPG – 6130/2017

**Título** – Solicitação de utilização de animais (peixes) no projeto intitulado: Citogenética molecular em parodontidae loricariidae: caracterização de genes e DNAs repetitivos.  
**Interessado** – Prof. Marcelo Ricardo Vicari

**Data de Entrada** – 5/4/2017**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – 28/04/2017 a 28/04/2019**Considerações**

Professor Marcelo Vicari (DEBIOGEM, vicarimr@yahoo.com.br)

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 60 (sessenta) peixes de peso variável.

Ponta Grossa, 03 de maio de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA - Comissão de Ética e Pesquisas com Animais  
*Dra. Dionízia Xavier Scamporrin*  
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria – anexa a PROESP  
Fone: (042) 3220-3264

### **ANEXO 3**

#### **Suspensão de Levedura (CAVALLINI; BERTOLLO, 1988)**

A técnica de suspensão de levedura consiste em uma mistura (0,5 g de fermento biológico + 1,5 g de dextrose + 6 mL de H<sub>2</sub>O) que deve ser injetada no peixe na região intraperitoneal em uma proporção de 1 mL / 100 g de peso animal. Este procedimento deve ser realizado 24 horas antes de iniciar as preparações de cromossomos mitóticos, com o intuito de induzir o aumento do número de células em divisão.

#### ANEXO 4

##### **Obtenção de cromossomos mitóticos (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978)**

1. Injetar intra-abdominalmente uma solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso do animal. Manter o peixe em aquário bem aerado durante 30 - 40 minutos.
2. Anestesiá-lo com uma dose de óleo de cravo, sacrificando-o em seguida.
3. Retirar uma porção do rim anterior, transferindo-a para uma cuba contendo cerca de 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), pré-aquecida à 37°C e dissociar as células com pinças de dissecação e seringa hipodérmica desprovida de agulha.
4. Incubar o material em estufa à 37°C durante 25 - 30 minutos.
5. Retirar a suspensão celular da estufa, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur transferir o material para um tubo de ensaio, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.
6. Adicionar de 5 a 10 gotas de fixador Carnoy (3 partes de metanol para uma parte de ácido acético) recém preparado, ressuspender levemente o material com a pipeta de Pasteur. Centrifugar durante 10 minutos à 1200 rpm.
7. Descartar o material sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Adicionar de 5 a 7 mL de fixador, ressuspender o material e centrifugar por mais 10 minutos.
8. Repetir o passo 7 mais duas vezes.
6. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 7- 10 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugar durante 10 minutos.
7. Repetir o passo 6 mais duas vezes.
8. Após a última centrifugação eliminar o sobrenadante, adicionar de 1 a 2 mL de fixador (dependendo da quantidade material obtido) e ressuspender o material.
9. Acondicionar em tubos de plástico tipo *Eppendorf*, e armazená-los no freezer.



**Obtenção de Cromossomos Mitóticos - via cultura de campo**  
**(BLANCO et al., 2012)**

Este método consiste em iniciar a preparação cromossômica logo após a captura dos animais no campo.

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal e manter o espécime vivo por 45 – 50 min.
2. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
3. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 6 ml da solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociar as células com uma seringa desprovida de agulha, homogeneizar e incubar em temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Acrescentar 2 ml de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, ressuspender o material repetidas vezes. Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, com os tubos mantidos em refrigeração até o acesso ao laboratório (até 168h).
5. Homogeneizar e centrifugar durante 10 minutos, a 1000 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur.
6. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, ressuspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 1000 rpm.
7. Repetir o último passo.
8. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e ressuspender bem o material.
9. Acondicionar em microtubos, podendo ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

## ANEXO 5

### Preparo de lâminas

Obtenção das metáfases por meio do procedimento de coloração convencional com Giemsa:

1- Pingar de uma a três gotas de suspensão celular sobre uma lâmina recém lavada e esquentada com água à 60°C, permitindo que o excesso de material escorra sobre papel absorvente.

2- Colocar as lâminas em um suporte, para que sequem em temperatura ambiente.

3- Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), pH= 6,8, por 7 a 10 minutos.

4- Lavar as lâminas com água destilada e secar naturalmente.

## ANEXO 6

### **Determinação de heterocromatina constitutiva (SUMNER, 1972), com modificações (LUI et al., 2009)**

- 1- Incubar a lâmina em solução de HCl 0,2N à 42°C por aproximadamente 10 min.
- 2- Lavar em água corrente e deixar secar.
- 3- Colocar a lâmina em solução aquosa de Ba (OH)<sub>2</sub> 8H<sub>2</sub> 5% recém preparado durante 2 a 3 min em temperatura ambiente.
- 4- Mergulhar três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.
- 5- Incubar a lâmina em solução salina 2xSSC (pH=6,8) à 60°C por aproximadamente 45 min.
- 6- Lavar em água corrente e deixar secar.
- 7- Corar as lâminas com iodeto de propídio, em uma proporção de 50 µg/mL diluído em 200 µL “antifade” (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid) e cobri-las com uma lamínula.

## ANEXO 7

### Extração de DNA - protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990)

A extração do DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo). Para isto, foi retirado um pequeno pedaço (15mm<sup>3</sup>) do fígado ou músculo do animal e este foi colocado em um microtubo contendo 360 µl de tampão (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M) sem CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio). Após, foi acrescentado 13 µl de proteinase K (10mg/mL), 5 µl de β-mercaptoetanol e 240 µl de CTAB 5% cristalizado. Posteriormente a solução foi incubada em banho-maria a 55°C, *overnight* ou, até digerir totalmente o tecido. Após este período foram adicionados 600 µl de clorofórmio sob agitação por 5 minutos em vortex suave. Em seguida o material foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferindo para um novo tubo. Neste foram adicionados 600 µl de etanol absoluto e reservado a – 20 °C por 2 horas ou *overnight*. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol a 70 v/v, sem agitar. A seguir, o material foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco em estufa a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 5 µl de RNase 20 mg/mL e o material foi mantido na estufa a 37 °C por 1 h. Em seguida foi inativado a RNase a 65 °C por 15 minutos e o DNA resultante foi armazenado no freezer.

## ANEXO 8

### **Purificação do produto da PCR pelo kit da GE healthcare - illustraGFX PCR DNA**

O protocolo consistiu na adição de 500 µl do capture buffer type3 à 100 µl de amostra (10 µg) e centrifugação por 30 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, o líquido do fundo do tubo que contém a amostra foi coletado e transferido para a microSpin Collumn. Esta foi centrifugada por 30 segundos a 16.000 rcf. Na sequência, todo o conteúdo do tubo coletor foi descartado, mantendo a microSpin Collumn. Em seguida, 500 µl da Wash buffer type1 foi adicionada a amostra e centrifugada por 30 segundos a 16.000 rcf. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e novamente centrifugado por 20 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, a microSpin Collumn foi transferida para um microtubo novo, onde permaneceu para evaporar o álcool a 70° C por 3 minutos. Após, 25 µl do tampão type 6 a 70°C, foi adicionado a amostra, reservado por 1 minuto e, centrifugado por 1 minuto a 16.000 rcf. A solução que passou pela a microSpin Collumn foi coletada e estocada a – 20 °C.

## **ANEXO 9**

### **Marcação de sondas por nick translation, kit dig-nick translation mix (Roche Applied Science)**

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante. Pipetar os seguintes componentes em tubo de 0,2 ml no gelo: x  $\mu$ l produto de PCR (equivalente a concentração de 1000-1500 ng/ $\mu$ l); 4  $\mu$ L mix de digoxigenin nick translation; completar para o volume total de 20  $\mu$ l com x  $\mu$ l água qsp; permanecer durante 1 hora e 30 minutos a 15° C; interromper aquecendo por 15 minutos a 65° C.

## ANEXO 10

### Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) segundo Pinkel, Straume e Gray (1986)

#### A. Preparação da solução de hibridação

Em todas as FISH, a mistura de hibridação consistiu de: 25 µl formamida (50% de formamida); 10 µl sulfato de dextrano 50% (concentração final de 10%); 5 µl de 20x saline salt citrate - SSC (concentração final 2x SSC); 6 µl de H<sub>2</sub>O qsp, perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 4 µg da sonda (DNA marcado com digoxigenina 11dUTP). A estringência destas misturas de hibridação foi de 77 %. Em seguida, a solução de hibridação foi levada ao termociclador, durante 10 minutos, a 99 °C para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

#### B. Preparação das lâminas (lavagens pré-hibridação)

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em tampão fosfato (phosphate buffer saline-PBS), por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada incubação. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1 %/ PBS 1x / MgCl<sub>2</sub> 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada incubação. As lâminas foram então tratadas com formamida 70 % dissolvida em 2x SSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol gelado a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada banho.

#### C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2x SSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de 2x SSC pH 7,0 por 20 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em



90 µl de tampão non fat dry milk (NFDM) a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas uma mistura de 100 µl de tampão NFDM contendo 1:1000 de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/ml e; 5:1000 de anti digoxigenina rodamina a 1 µg/ml; permanecendo por 1 h a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - 0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka<sup>®</sup>).